



Acción del extracto de *Calendula officinalis* en la preservación ósea posterior a extracción

Laura K. Uribe-Fentanes,^a Fernando Soriano-Padilla,^b
Jorge Raúl Pérez-Frutos,^a Miriam Alejandra Veras-Hernandez^c

Action of *Calendula officinalis* essence on bone preservation after the extraction

Background: *Calendula officinalis* is a phytodrug used as analgesic, anti-septic and wound-healing agent due to its collagenogenic effect, which is why it is a convenient and affordable treatment that promotes alveolar bone preservation after tooth extraction in vivo. The aim of this study was to use *Calendula officinalis* during and after tooth extraction to determine its ability to preserve bone after this procedure.

Methods: We established two groups matched by age, gender and position of the third molar. We used with patients on the experimental group *Calendula officinalis* diluted 10% as an irrigant during surgical extraction of third molars. We performed the conventional way with the control group irrigating with saline solution. Subsequently, both groups continued to make mouthwash for a week with the irrigating agent. Every week for a month, each patient underwent periapical radiography, out of which we took measurements of alveolar ridges and depth of alveolar bone, which were compared.

Conclusion: There is statistically significant evidence to state that *Calendula officinalis* favorably affects bone preservation after extraction.

Keywords Palabras clave

Calendula officinalis	Calendula officinalis
Alveolar bone loss	Pérdida de hueso alveolar
Tooth extraction	Extracción dental
Alveolar Crest	Cresta Alveolar

Los continuos avances en el campo odontológico han demostrado la necesidad que existe de preservar el volumen adecuado de hueso después de una extracción. Al finalizar la cicatrización alveolar se observa retracción de la herida y del proceso alveolar en forma sagital y longitudinal debido a la ausencia del órgano dentario, lo cual además de dificultar la restauración protésica en áreas que lo necesitan, desfavorece la estética y en algunos casos puede empeorar la pérdida de soporte periodontal de los dientes adyacentes. Se ha demostrado que no es posible evitar tal efecto, por lo que se han desarrollado múltiples tratamientos y procedimientos para devolver el volumen óseo. Sin embargo, estos tratamientos requieren un doble procedimiento quirúrgico y, por lo tanto, un doble costo, además de la posibilidad de complicaciones en otras áreas.

El extracto de *Calendula officinalis* ha sido utilizado para reducir el tiempo de cicatrización de las heridas con resultados significativos comprobados, ya que posee capacidad collagenogénica, por lo que posiblemente también tenga un efecto favorable en la preservación ósea posterior a la extracción, lo que permitirá en un menor tiempo que la zona postextracción no presente retracción ni provoque pérdida de soporte de los dientes adyacentes.

Antecedentes

La *Calendula officinalis* es una planta silvestre que en nuestro país crece en abundancia en primavera y verano, especialmente en los estados de Puebla, Morelos y Michoacán. Sus flores son utilizadas tanto desde el punto de vista ornamental como para la preparación de fitofármacos. Pertenecen a la familia de las asteráceas de 30 a 60 cm de altura; consta de hojas simples, alternas, algo gruesas, ovaladas, enteras o diminutas y remotamente denticuladas; tiene cabezuelas solitarias en pedúnculos robustos, vistosos de 3.75 a 5 cm de diámetro; sus radios son planos, extendidos de color amarillo blanquecino hasta anaranjado subido; a veces

^aServicio de Cirugía Oral y Maxilofacial, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez, Chihuahua

^bJefatura del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial

^cServicio de Cirugía Oral y Maxilofacial

^{b,c}Hospital de Pediatría "Silvestre Frenk Freund", Centro Médico Nacional Siglo XXI, Ciudad de México

México

Comunicación con: Jorge Raúl Pérez-Frutos

Teléfono: (656) 296 3620

Correo electrónico: jorge_p86@hotmail.com

Recibido: 29/01/2016

Aceptado: 07/12/2016

Introducción: la *Calendula officinalis* es un fitofármaco al que se le atribuyen múltiples usos, entre los que destacan el de analgésico, antiséptico y cicatrizante por su efecto colagenogénico, lo que lo hace un tratamiento conveniente y económico que favorece la preservación ósea alveolar después de la extracción dental *in vivo*. El objetivo del presente estudio fue utilizar la *Calendula officinalis* durante y después de la extracción dental para determinar si tiene capacidad de preservación ósea después de la extracción.

Métodos: se seleccionaron dos grupos pareados por edad, género y posición del tercer molar. A un grupo experimental se le aplicó *Calendula officinalis* diluida al 10% en solución fisiológica como agente irrigante

durante la extracción quirúrgica del tercer molar. Al grupo control se le realizó el procedimiento de manera convencional irrigando con solución fisiológica. Posteriormente ambos grupos continuaron realizando colutorios durante una semana con el agente irrigante. Durante un mes a cada paciente se le realizó semanalmente la toma de radiografía periapical con radióvisiógrafo a la cual se le tomaron medidas de crestas alveolares y profundidad alveolar que fueron comparadas.

Conclusión: existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que la *Calendula officinalis* influye favorablemente en la preservación ósea posterior a la extracción.

Resumen

la planta es prolifera desde el involucro y porta varias cabezuelas pedunculadas en un círculo.¹

Las decocciones de las flores de *Calendula officinalis* tienen un amplio uso, como el analgésico, el antiséptico y el de la cicatrización de heridas en piel y mucosas.² Además, se presenta en crema y ungüento para aplicación tópica oftálmica, ótica, nasal, oral, dérmica y en solución para uso sistémico en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, hepatitis y enfermedades cardiovasculares, como, por ejemplo, la hipertensión.^{3,4}

También se ha demostrado su propiedad antiinflamatoria⁵ y su efecto cicatrizante en ratas y en pacientes.⁶ Su uso mostró un marcado efecto colagogo en ratas al ser administrado en dosis de 0.05 g/kg/día y también resultó benéfico en el tratamiento de hepatitis inducida por tetracloruro de carbono.⁷

Otros de sus componentes son ácidos orgánicos, en específico el ácido salicílico, que le confiere acciones emenagoga, antiespasmódica y antiagregante plaquetaria.

Sistema estructural del hueso

El hueso puede ser clasificado en cuatro componentes microestructurales: células, matriz orgánica, matriz inorgánica y factores solubles. Los componentes macroestructurales son integrados en orden distintivos: hueso cortical y hueso esponjoso.⁸ A continuación se define cada uno de los componentes.

Microestructura

Células

Hay muchas células fenotipo asociadas con el hueso; sin embargo, el enfoque es en tres: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.

Los osteoblastos son derivados de un linaje de células mesenquimales. La progresión no diferenciada de los tallos de las células mesenquimales a estado osteoblástico puede tomar dos rutas, una principal determinada para células osteoprogenitoras y la otra para inducir células osteoprogenitoras.

Los osteocitos son células relativamente inactivas, ya que su actividad metabólica suave es crucial para la supervivencia del hueso y para mantener la homeostasis. Los osteoblastos, osteoclastos y osteocitos son los artífices celulares ejecutores de roles administrativos en la regulación de calcio y la homeostasis del hueso, procesos fisiológicos fundamentales para modelación y remodelación.^{8,9}

Matrices

Aproximadamente 35% del peso seco del hueso es matriz orgánica. El colágeno tipo I es el principal componente (cerca del 90%) de la matriz orgánica: el restante 10% consiste en componentes no colágenos.

Los roles funcionales de la matriz extracelular son integrados con sus componentes individuales: colágenos, moléculas no colágenas y sustancia base. Los colágenos completan la espina fibrosa de la matriz extracelular y pueden incluir una membrana interior colágena fibrilar de tipos I, II, III, V y XI y no fibrilar de tipo IV.

La matriz inorgánica, también referida como la sección mineralizada, contiene cantidades de cerca de 60 a 70% del peso seco del hueso.

Macroestructura

Los componentes microestructurales del hueso (células, moléculas e iones) son integrados y cedidos a la macroestructura: hueso cortical (compacto) y hueso esponjoso (trabecular). La forma macroestructural, las propiedades funcionales (por ejemplo, la protec-

ción y la locomoción) y las propiedades fisiológicas (necesidades metabólicas, como el balance de calcio) han sido ya explicadas ampliamente¹⁰ y no se tratarán en este documento.

Hueso cortical

En apariencia, el hueso cortical se ve denso y compacto. Ello constituye cerca del 80% del esqueleto. El hueso cortical está diseñado para proteger órganos vitales, para resistir retos biofuncionales, para facilitar la locomoción y para suministrar refugio seguro para la hematopoyesis.⁸

Hueso esponjoso

Un enrejado tridimensional del trabeculado es la marca característica en esta estructura. En general, la orientación espacial del trabeculado es al azar. Este no tiene responsabilidad de carga biofuncional como el hueso cortical.^{8,11}

Cicatrización alveolar

Inmediatamente después de la extracción de un diente, el alvéolo es ocupado por la hemorragia que en pocos minutos se transforma en coágulo. Mientras que en las primeras horas se observan residuos de alimentos y saliva en la entrada del alvéolo sobre el coágulo, en el centro del coágulo aparecen espacios rellenos con fluidos y a las 24 horas ya se observa fibrina y células tipo fibroblastos en la periferia del coágulo.¹² Con dos días de cicatrización se nota la sustitución del coágulo por tejido de granulación.¹³ Al tercer día se observa intensa actividad celular cuando inicia la angiogénesis.¹⁴ Esta evolución continúa observándose a los cuatro días: una red de fibrina y tejido de granulación característico ocupan la periferia del alvéolo con una nítida y recién construida red de capilares. Del quinto al séptimo día a través de mecanismos de quimiotaxis, el factor de crecimiento derivado de plaquetas atrae macrófagos y a partir de ahí los procesos regenerativos serán estimulados por factores de crecimiento derivados de macrófagos. Una vez transcurridos siete días de cicatrización se observa inicio de formación ósea en el ápice y en las paredes laterales próximas, a nivel del tercio apical del alvéolo.

El que se produzca tejido fibroso (reparación) en vez de tejido óseo (regeneración), está favorecido por

- Infección que impide que se repare el tejido conectivo, lo cual perpetúa la respuesta inflamatoria.
- Alteración en el aporte sanguíneo y por tanto en el aporte de oxígeno (de origen local o por alguna

enfermedad vascular, como alteraciones hematológicas, tabaco, diabetes mellitus...).

- Uso de materiales no biocompatibles (la irritación crónica favorece la fibrosis).
- Insuficiente inmovilización (la movilidad está en el origen de la fibrosis).
- Falta de células necesarias o señales estimulantes o neutralizantes del proceso de regeneración, por edad o por enfermedad (para que haya regeneración debe haber células osteogénicas).
- Invasión de los tejidos blandos en la zona que se va a restaurar, ya que no se mantiene el espacio.¹⁴

Por lo tanto nuestra hipótesis es que la aplicación tópica de *Calendula officinalis* favorece la preservación ósea posterior a la extracción. Nuestro objetivo general consistió en determinar el efecto que tiene la *Calendula officinalis* en la preservación ósea posterior a la extracción y nuestros objetivos específicos estribaron en determinar, por un lado, si el uso de este fitofármaco contribuye a reducir la pérdida ósea postextracción y, por el otro, describir el efecto de la aplicación tópica de *Calendula officinalis* en la herida después de la extracción.

Métodos

Estudio descriptivo, prospectivo y longitudinal que se llevó a cabo en pacientes que acudieron al servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ) durante el periodo de agosto a octubre de 2013 y que al ser diagnosticados con impactación de terceros molares, requerían que estos fueran extraídos por disección.

Los pacientes que se incluyeron fueron de cualquier género, en edades de 18 a 40 años, con presencia del segundo molar sin enfermedad periodontal y sistémicamente sanos; fueron elegidos de manera aleatoria.

Asimismo, se excluyeron todos aquellos pacientes que no cumplían con los criterios de inclusión y aquellos que presentaron alguna complicación durante la cirugía.

En cuanto a las variables la independiente fue la *Calendula officinalis* y la dependiente, la preservación ósea.

Se formaron dos grupos de pacientes elegidos aleatoriamente: grupo A: testigo y grupo B: experimental. Esto se llevó a cabo sin preferencia de género, edad o enfermedades agregadas.

A cada paciente que se presentó en el servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial, durante el periodo de agosto a octubre de 2013, se le realizó historia clínica y exploración física para determinar su elegibilidad para el estudio. Una vez seleccionado, se le explicó

ampliamente acerca de los detalles del estudio. El paciente aceptó su participación voluntaria al firmar una hoja de consentimiento, para poder programar la cirugía. Cada paciente acudió a valorar su ortopantomografía y a realizar la medición de apertura máxima.

Al iniciar la cirugía, se tomó una radiografía periapical con radiovisiógrafo marca Kodak. Posteriormente, con técnicas de asepsia y antisepsia y colocación de campos estériles, se infiltró articaína con epinefrina al 1:100 000 con técnica convencional al nervio dentario inferior; se realizó incisión de espesor total contorneante con hoja de bisturí No. 11 y posteriormente disección del colgajo.

Se realizó osteotomía con fresa 702L y micro-motor quirúrgico marca NSK modelo MIO, siempre a 30 000 RPM. Durante el fresado quirúrgico, fuera por osteotomía o por odontosección, se le realizó irrigación al grupo B de *Calendula officinalis*, tintura madre del laboratorio Similia, diluida al 10% en solución fisiológica, y al grupo A solamente con solución fisiológica. Finalmente se suturó la herida con *catgut* crómico 5-0. Al terminar el procedimiento se tomó radiografía periapical con radiovisiógrafo, se colocó una gasa compresiva impregnada para el grupo A con solución fisiológica y para el grupo B con el preparado de *Calendula officinalis* en la zona de la extracción durante 30 minutos (figura 1).

A cada paciente se le entregó un frasco de 25 mL, para el grupo A con solución fisiológica y para el grupo B con tintura madre de *Calendula officinalis*. También se les proporcionó una hoja de indicaciones sobre medidas higiénico-dietéticas y una receta por ibuprofeno de 600 mg (antiinflamatorio y analgésico de leve a moderado); además, se les dio la explicación para diluir el contenido del frasco que se les proporcionó y realizar colutorios después del cepillado dental durante siete días y ketorolaco 30 mg sublingual (analgésico y antiinflamatorio de moderado a severo) para utilizarse en caso necesario.

Para la valoración clínica postoperatoria se evaluaron cuatro criterios:

- Dolor: este se evaluó mediante la escala visual análoga (EVA), en la que el paciente califica su dolor de 0 a 10, donde el cero es ausencia total de dolor y 10 dolor muy intenso. Además se les cuestionó sobre la necesidad de utilizar uno o ambos analgésicos.
- Apertura bucal: antes de iniciar el procedimiento y cada semana durante la evaluación clínica, se realizó la medición de apertura máxima con un vernier de acero inoxidable, milimetrado como parámetro para valorar la respuesta a la inflamación y al trauma quirúrgico.

- Sangrado: cada paciente fue cuestionado sobre la persistencia de sangrado al retirar la gasa compresiva.
- Presencia de infección: durante la evaluación semanal se realizó exploración de la herida y en caso de presentar el cuadro clínico compatible con proceso infeccioso agudo (como la persistencia de inflamación con bordes eritematosos, dehiscencia de la herida o incluso presencia evidente de exudado purulento), se determinó la necesidad de utilizar un antibiótico. Todos los datos fueron recabados en la herramienta diseñada para tal efecto.

Para el análisis de preservación ósea posterior a la extracción, se utilizó la radiografía postoperatoria inmediata como referencia y a cada radiografía se le realizaron las siguientes mediciones:

- De la unión cemento-esmalte del segundo molar (UCE) a la cresta alveolar distal del segundo molar (CAD7).
- De la CAD7 a la cresta alveolar distal del tercer molar (CAD8).
- De la CAD7 a la profundidad alveolar (PA) (figura 1).

Todos los datos fueron recabados en la herramienta diseñada para tal efecto (figura 2).

Resultados

En el periodo de agosto a octubre de 2013, se realizaron 85 procedimientos, de los cuales 44 (52%) fueron terceros molares inferiores, 38 terceros molares superiores, tres dientes supernumerarios retenidos y un canino superior retenido. Los 44 pacientes fueron divididos en dos grupos pareados por edad, género y posición de tercer molar. El 63.6% fueron del género femenino y 36.3% del género masculino, con un rango de edades de 18 a 40 años, media y mediana de 22 años y moda de 23 años. Los grupos fueron integrados por 14 mujeres y ocho hombres en cada grupo, con 11 terceros molares inferiores derechos y 11 terceros molares inferiores izquierdos.

En la figura 3 se presentan los resultados de los promedios de las medidas de la preservación de cresta alveolar (medida de UCE a CAD7). En la figura 4 se presentan los resultados de los promedios de las medidas tomadas para medir la cicatrización alveolar (medida de CAD7 a CAD8). En la figura 5 se presentan los resultados de los promedios de las medidas tomadas para medir la profundidad alveolar (medida de CAD7 a PA). Radiográficamente no fue posible establecer la densidad ósea.



Figura 1 Secuencia del procedimiento de izquierda a derecha: ortopantomografía, apertura bucal máxima inicial, incisión contornante, elevación del colgajo, luxación, avulsión del tercer molar y sutura, radiografía preoperatoria, motor NSK de baja velocidad y radiografía postoperatoria inmediata

Efecto de la *Calendula officinalis* posterior a la extracción

Durante el procedimiento quirúrgico inicial, cuatro pacientes fueron excluidos del estudio, dos del grupo A y dos del grupo B debido a que presentaron complicaciones durante el procedimiento que podrían afectar la cicatrización ósea. A la primera semana fueron

excluidos del estudio 14 pacientes del grupo A y tres del grupo B por presencia de infección, dado que es un factor que interfiere con la cicatrización ósea.

El promedio de dolor en las primeras 24 horas para el grupo experimental fue de 5, mientras que para el grupo control fue 7; para la primera semana fue de 0 para el grupo experimental y 2 para el grupo control.



Figura 2 Los parámetros de la unión cemento-esmalte del segundo molar (UCE) a la cresta alveolar distal del segundo molar (CAD7) (A); de la CAD7 a la cresta alveolar distal del tercer molar (CAD8) (B), y de la CAD7 a la profundidad alveolar (PA) (C)

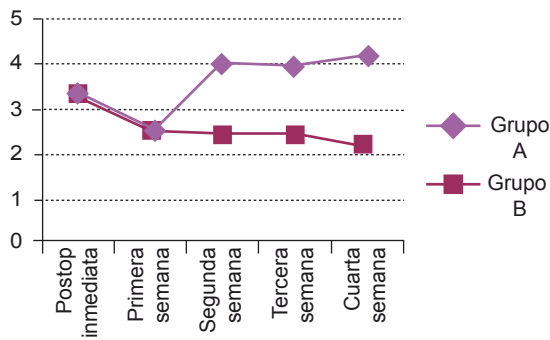


Figura 3 Gráfica de los promedios obtenidos cada semana de la medida 1 que va de la unión cemento-esmalte a la cresta alveolar distal del segundo molar (UCE-CAD7)

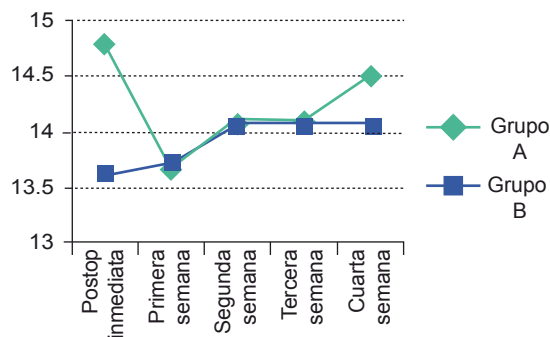


Figura 4 Promedios obtenidos cada semana de la medida 2, los cuales permiten valorar la cicatrización alveolar en ambos grupos

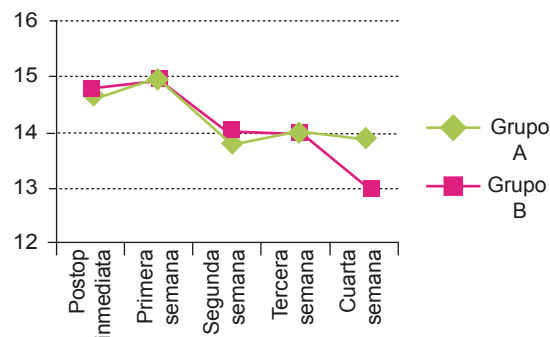


Figura 5 Promedios de las medidas tomadas para medir la profundidad alveolar

A partir de la segunda semana fue 0 para ambos grupos.

Todos los pacientes utilizaron ibuprofeno durante las primeras 72 horas. En la primera semana todos los pacientes del grupo control continuaron utilizándolo y ninguno del grupo experimental.

El uso de ketorolaco a las 24 horas fue necesario en 11 pacientes del grupo experimental y en 18 pacientes del grupo control y durante la primera semana solo

siete pacientes del grupo control aún lo necesitaban (figura 6). El promedio de apertura bucal máxima inicial fue de 52 mm en ambos grupos. Para el grupo control, los promedios oscilaron entre 37 mm y 49 mm, mientras que para el grupo experimental, los promedios oscilaron entre 39 y 52 mm.

Doce pacientes del grupo control refirieron sangrado al retirar la gasa compresiva, ninguno del grupo experimental. Catorce pacientes del grupo A requirieron utilizar un antibiótico durante la primera semana del postoperatorio, mientras que solo a tres del grupo B se les prescribió un antibiótico (figura 7).

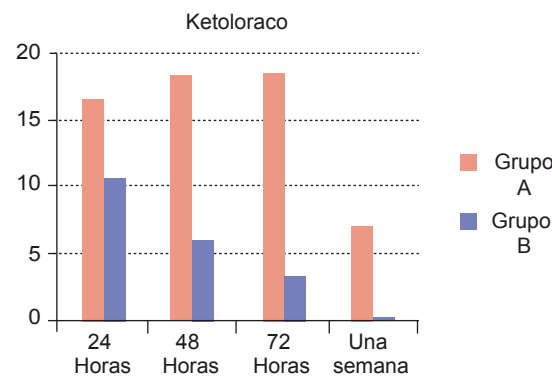
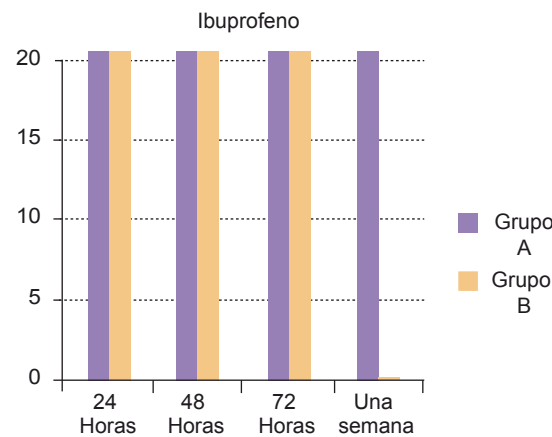
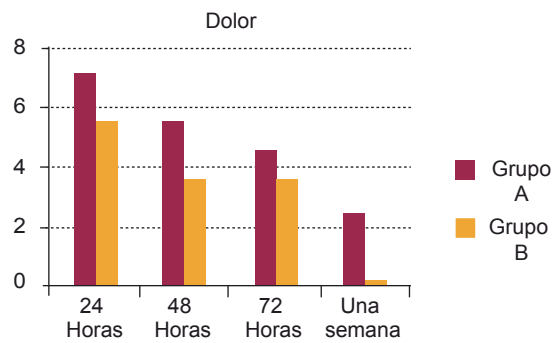


Figura 6 Comportamiento de ambos grupos frente al dolor y la necesidad de utilizar analgésicos a las 72 horas

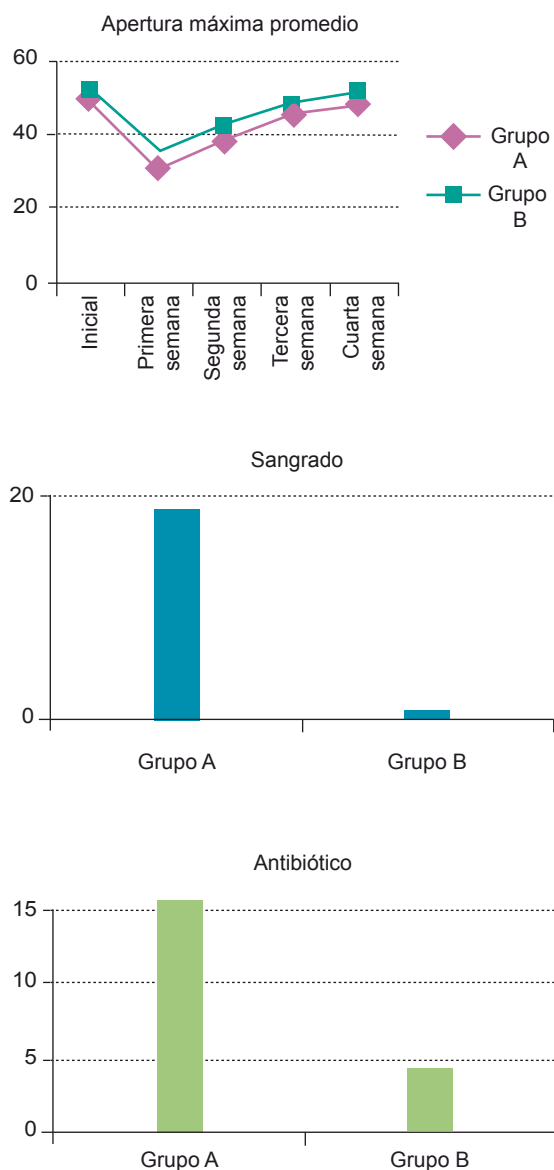


Figura 7 Promedios de apertura bucal realizados cada semana; la gráfica del comportamiento frente al sangrado a las 24 h y la gráfica de la izquierda pacientes por grupo que necesitaron medicarse con un antibiótico

Análisis estadístico

En la tabla de contingencia 2×2 para dolor se encontró que la diferencia de riesgo (DR) por el uso de *Calendula officinalis* fue de 31% y el cálculo de riesgo relativo (RR) < 1 . Se calculó chi cuadrada a partir de los datos de la tabla de contingencia para correlacionar los criterios de evaluación clínica con el uso de *Calendula officinalis*. Se observó que el valor de la tabla para chi cuadrada a 1 grado de libertad y con un intervalo de confianza al 95% (IC 95%) es igual a 3.83 y la chi cuadrada calculada fue de 25.5 ($p > 0.05$).

Asimismo, se realizó el análisis estadístico de la tabla de contingencia 2×2 para infección. Encontramos que la DR por el uso de *Calendula officinalis* fue de 12% y el cálculo de RR < 1 . Se calculó la chi cuadrada a partir de los datos de la tabla de contingencia para correlacionar los criterios de evaluación clínica con el uso de *Calendula officinalis*. Se observó que el valor de la tabla para chi cuadrada a 1 grado de libertad y con un IC al 95% es igual a 3.83 y la chi cuadrada calculada fue de 55 ($p > 0.05$).

Se determinó la eficacia de la *Calendula officinalis* en la preservación ósea con el análisis de varianza (ANOVA) y se rechazó la hipótesis nula, dado que $p < 0.05$, por lo que existe evidencia estadísticamente significativa para afirmar que la *Calendula officinalis* influye favorablemente en la preservación ósea postextracción.

Discusión

Los efectos antiséptico y analgésico de la *Calendula Officinalis* han sido ampliamente estudiados y demostrados previamente por Akihisa et al. en 1996, Bakó et al. en 2002 y Chandran et al. en el 2008.^{2,15,5} En el presente estudio se observó que la *Calendula officinalis* puede ser utilizada como medida preventiva e incluso como posibilidad terapéutica frente al dolor y la infección postoperatoria, no solo por su efectividad, sino también por su fácil aplicación trans y postoperatoria. Además, es un fitofármaco de bajo costo al que puede tener acceso toda la población, lo cual impacta positivamente en el éxito del procedimiento con mínimas molestias.

El uso tópico de *Calendula officinalis* favorece la rápida recuperación del paciente, debido a su efecto en la cicatrización. En este estudio se evidenció tal efecto al observar que la apertura bucal se recupera al 65% en el 85% de los casos durante la primera semana y el sangrado postoperatorio es inhibido en el 90% de los casos durante las primeras 24 horas postoperatorias. Por lo anterior, se observa que el uso de la *Calendula officinalis* disminuye la necesidad de cuidados postoperatorios especiales como reposo y alimentación líquida, lo que deriva en la incorporación prácticamente inmediata a la vida cotidiana, contribuyendo así a la adecuada calidad de vida.

A pesar de que en la actualidad existen tratamientos efectivos disponibles para acelerar el proceso de formación de hueso alveolar, utilizarlos implica un muy alto costo que es inaccesible para cierta población. Además, se requieren aparatos especializados e instrumentación tecnológica avanzada, la cual es de difícil adquisición para el profesionista. Por otro lado, también está la desventaja de requerir de dos o tres eventos quirúrgicos más como obtención de tejidos o abordajes en otras

áreas del cuerpo, lo que podría significar la presencia de complicaciones en otras zonas. Lo anterior provoca, en múltiples ocasiones, que el deseo de preservar la estructura ósea postextracción resulte en una negativa del paciente al tratamiento. En el presente estudio, el uso de *Calendula officinalis* demostró evidencia estadísticamente significativa para afirmar que su uso tópico favorece la preservación ósea. Estos resultados podrían confirmar que la *Calendula officinalis* afecta directa-

mente la matriz extracelular ósea durante la etapa de actividad fibroblástica de la cicatrización.

Declaración de conflicto de interés: los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflictos potenciales de interés del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no fue reportado alguno que tuviera relación con este artículo.

Referencias

1. Aguilar-Gil B, Méndez-Castillo R, González-Roque C, Fernández-Fernández D. Extracto acuoso de *Calendula officinalis*. Estudio preliminar de sus propiedades. *Rev Cubana Plant Med*. 2000;5(1):30-1.
2. Akihisa T, Yasukawa K, Oinuma H, Kasahara Y, Yamanouchi S, Takido M, et al. Triterpene alcohols from the flowers of *compositae* and their antiinflammatory effects. *Phytochemistry*. 1996;43(6):1255-60.
3. Amirghofran Z, Azadbakht M, Karimi MH. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *J Ethnopharmacol*. 2000;72(1-2):167-72.
4. Amoian B, Moghadamnia AA, Mazandarani M, Amoian MM, Mehrmanesh S. The effect of *Calendula* extract tooth paste on the plaque index and bleeding in gingivitis. *J MedPlant*. 2010;4:132-40.
5. Chandran PK, Kuttan R. Effect of *Calendula officinalis* flower extract on acute phase proteins, antioxidant defense mechanism and granuloma formation during thermal burns. *J Clin Biochem Nutr*. 2008;43: 58-64.
6. Cordova CA, Siqueira IR, Netto CA, Yunes RA, Volpato AM, Cechinel Filho V et al. Protective properties of butanolic extract of the *Calendula officinalis* L. (marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. *Redox Rep*. 2002;7(2):95-102.
7. Duran V, Matic M, Jovanovic M, Mimica N, Gajinov Z, Poljacki M, et al. Results of the clinical examination of anointment with marigold (*Calendula officinalis*) extract in the treatment of venous leg ulcers. *Int J Tissue React*. 2005;27:101-6.
8. Anitua-Aldecoa E. Un Nuevo Enfoque en la Regeneración Ósea. Ed. Vitoria; 2000.
9. Greenberg M. *Burket's Oral Medicine*. 11th edition. Hamilton, Ontario: BC Decker Inc; 2008. pp. 178-179.
10. Kitanaka S, Takeyama K, Murayama A, Sato T, Okumura H, Nogami M, et al. Inactivating mutations in the 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase gene in patients with pseudovitamin D-deficiency rickets. *N Engl J Med*. 1998;338:653-61.
11. Hellinger JO, McAllister BM. Bone and its repair. London Pergamon-Elsevier Science. 1995;3(99):28.
12. Ehnevid H, Jansson L, Lindskog S, Blomlöf L. Periodontal healing in teeth with periapical lesions. A clinical retrospective study. *J Clin Periodontol*. 1993; 20(4):254-8.
13. Genco RJ, Ho AW, Kopman J, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. Models to evaluate the role of stress in periodontal disease. *Ann Periodontol*. 1998;3(1):288-302.
14. Hart TC, Shapira L, van Dyke TE. Neutrophil defects as risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol*. 1994;64:521-9.
15. Bakó E, Deli J, Tóth G. HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. *J Biochem Biophys Methods*. 2002;53(1-3):241-50.