

Estudio de la Citotoxicidad de Cerámicas Biomórficas de SiC Recubiertas con Vidrio Bioactivo.

J.P. BORRAJO¹, P. GONZÁLEZ¹, J. SERRA¹, S. LISTE¹, S. CHIUSI¹, B. LEÓN¹, A. DE CARLOS², F.M. VARELA-FERIA³,
J. MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ³, A.R. DE ARELLANO-LÓPEZ³

¹Universidad de Vigo, Dpto. Física Aplicada, Lagoas-Marcosende, 36200 Vigo

²Universidad de Vigo, Dpto. Bioquímica, Genética e Inmunología, Lagoas-Marcosende, 36200 Vigo

³Universidad de Sevilla, Dpto. Física de la Materia Condensada, Apdo. 1065, 41080 Sevilla

La necesidad de desarrollar nuevos implantes basados en materiales bioactivos que sean capaces de soportar grandes cargas mecánicas ha llevado a la producción de sustratos metálicos recubiertos con cerámicas bioactivas. Recientemente se ha propuesto un dispositivo alternativo que consiste en un sustrato de carburo de silicio (SiC) biomórfico recubierto con vidrio bioactivo, mediante la técnica de Depósito por Láser Pulsado (PLD), y que dispone de la resistencia mecánica adecuada, además de gran ligereza y una porosidad intrínseca muy favorable de cara a la implantación. En este trabajo se presenta un estudio interdisciplinar de este nuevo material centrado en la morfología y porosidad de sustratos de SiC provenientes de diferentes maderas, la bioactividad de los recubrimientos producidos por PLD y en la evaluación in vitro con células de osteosarcoma MG-63 con la que se ha determinado la citotoxicidad de estos materiales y se ha estudiado la influencia de los mismos en la adhesión y la proliferación celular.

Palabras clave: Carburo de silicio biomórfico, Depósito por Láser Pulsado, bioactividad, test de proliferación celular, vidrio bioactivo.

Cytotoxicity study of biomorphic SiC ceramics coated with bioactive glass.

In the past years there was a need to develop new tough bioactive materials capable to resist high loads when implanted in the body, that led to the production of bioactive coatings on metallic substrates. A new approach, which consists of biomorphic silicon carbide (SiC) coated with bioactive glass by Pulsed Laser Deposition (PLD), was recently presented. This new material joins the high mechanical strength, lightness and porosity of biomorphic SiC and the bioactive properties of PLD glass films. In this work, a multiple evaluation of this new material is presented starting from the biomorphic SiC morphology and porosity, following with the bioactivity in simulated body fluid of the coatings, and ending with a deep in vitro study with MG-63 cells. The cytotoxicity of the SiC coated and uncoated and the cell proliferation and attachment were studied.

Keywords: Biomorphic silicon carbide, Pulsed Laser Deposition, bioactivity, cell proliferation test, bioactive glass

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace varias décadas se vienen utilizando materiales cerámicos para reparar o reconstruir partes del cuerpo dañadas, enfermas o desgastadas (1). Estos materiales se conocen con el nombre de biocerámicas y se clasifican, en función de su respuesta biológica, en inertes, bioactivas o reabsorbibles (1,2). Las cerámicas bioactivas han despertado un gran interés ya que dan lugar a un enlace interfacial muy fuerte entre el implante y el tejido vivo originando una mejor fijación del mismo en comparación con los materiales inertes. Sin embargo, el principal problema de las cerámicas bioactivas reside en su debilidad mecánica, que limita su uso a aplicaciones con bajas necesidades de carga. Ello ha llevado al desarrollo de dispositivos formados por un sustrato de resistencia adecuada recubierto con una cerámica bioactiva que posibilita la interacción química con los tejidos y por ende mayor fijación. Los sustratos metálicos (Ti, Ti6Al4V, o Cr-Co) recubiertos mediante pulverización de hidroxilapatita por plasma son los usados comercialmente y los únicos que cuentan con la autorización de la Food and Drug Administration americana (3).

Dentro de este tipo de solución se ha propuesto una nueva clase de implante que consiste en el uso de sustratos de carburo de silicio biomórfico recubiertos de vidrio bioactivo mediante Depósito por Láser Pulsado (PLD) (4). Este nuevo dispositivo toma del sustrato su ligereza debido a una baja densidad, resistencia mecánica y elevada porosidad intrínseca proveniente de la madera de origen y perfeccionada por la evolución natural (4-6); y del recubrimiento de vidrio, la capacidad de originar una capa de naturaleza apatítica similar al hueso cuando entra en contacto con los fluidos corporales que permite la unión química a los tejidos vivos (7).

El proceso de fabricación del sustrato consiste en la pirólisis de una pieza de madera en atmósfera inerte, con lo que se obtiene una preforma de carbón, y posterior infiltración con silicio fundido, lo que origina la reacción del silicio y el carbono dando lugar al carburo de silicio final, en el que se conserva la microestructura, el volumen y la forma de la pieza de carbón previa (5). La facilidad de modelado de la madera inicial y principalmente de la preforma de carbón añaden una ventaja más, ya que permite obtener piezas con

las dimensiones y la forma adecuadas de cara a la elaboración de prótesis.

El recubrimiento del sustrato mediante la técnica de PLD consiste en irradiar un vidrio bioactivo con un haz láser lo que provoca la evaporación y eyección de materiales ablacionados provenientes del vidrio que se dirigen, en vacío o en una atmósfera adecuada, hacia el sustrato sobre el que se desea depositar la película delgada. Este método permite la obtención de capas de materiales con una estructura química compleja y elevado punto de fusión, que reproducen la estequiometría del blanco, con ausencia de contaminantes y gran adherencia (8,9). Además, variando diferentes parámetros del proceso, como la energía del láser, la distancia blanco-sustrato, la temperatura del sustrato o atmósfera reactiva se pueden modular las características de las capas en función de las necesidades.

En este trabajo se demuestra la capacidad del SiC biomórfico recubierto con vidrio bioactivo y sin recubrir como material biocompatible para aplicaciones médicas mediante un estudio de bioactividad, citotoxicidad y proliferación celular in vitro. Estas pruebas son muchas veces la primera indicación de la que dispone el investigador para comprobar el comportamiento bioactivo y biológico de un material.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Carburo de silicio biomórfico.

Piezas de madera de haya, eucalipto y sapeli con la forma adecuada se secaron en una estufa durante 24 horas a una temperatura de 60 °C y luego se pirolizaron en atmósfera de Ar a 1000 °C con una rampa de temperatura de 0.5 °C/min. Las preformas de carbón se mecanizaron hasta obtener planchas de dos milímetros de espesor que se secaron e infiltraron con silicio puro en un horno en vacío a una temperatura de 1550 °C durante 30 minutos.

Las piezas finales resultantes del proceso de infiltración se estudiaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Se realizaron estudios de porosidad mediante tratamiento informático de imágenes SEM (ImageTool, UTHSCSA) que permitió determinar el área de cada poro y la suma total, con lo que se pudo estimar la distribución de tamaños de poro, el porcentaje de porosidad total para cada madera y el diámetro medio de poro. Para conseguir una muestra representativa se tomaron imágenes SEM en 5 puntos diferentes de cada muestra, y tres niveles de aumentos (20, 100 y 200X de cada punto).

2.2. Depósito por láser pulsado de vidrio bioactivo.

Las piezas de SiC biomórfico se lavaron en metanol mediante ultrasonidos y posteriormente fueron secadas e introducidas en la cámara de depósito (9). Se utilizó un láser de excimeros de ArF (193 nm, 4.17 J/cm², 25 ns y 10 Hz) para ablacionar vidrios con una composición, en porcentaje en peso, de SiO₂ 42%, Na₂O 20%, K₂O 10%, MgO 5%, CaO 20% y P₂O₅ 3%. Los productos de ablación se depositaron sobre los sustratos de SiC biomórfico encontrándose a una temperatura de 200 °C. La cámara de depósito se evacuó hasta un vacío de 6 x 10⁻⁶ mbar con una bomba turbomolecular y durante el depósito se utilizó una bomba rotatoria. Una vez producidos los recubrimientos se conservaron las piezas sumergidas en alcohol isopropílico en contenedores de poliestireno.

2.3. Pruebas in vitro: Bioactividad y biocompatibilidad del material.

La bioactividad del SiC biomórfico recubierto con vidrio bioactivo se comprobó por inmersión de las piezas en 50 mL de fluido corporal simulado (SBF) (10), con una composición iónica casi idéntica al plasma sanguíneo, durante 72 horas a una temperatura de 37 ± 0.5 °C. Tras este tiempo se lavaron en agua destilada y se secaron para ser observadas por SEM y estudiadas por espectroscopía de dispersión de energías (EDS).

Para el estudio de biocompatibilidad se ha utilizado la línea celular de osteosarcoma humano MG-63 suministrada por la "European Collection of Cell Cultures" (ECACC, Salisbury, Reino Unido) mediante las que se ha evaluado la citotoxicidad así como la proliferación y adhesión en el material. Las células se cultivaron en un frasco de cultivo en medio Earle's modificado (EMEM) con un suplemento del 10% de suero fetal bovino, un 1% de antibiótico, L-glutamina y vitamina C. Esta línea celular crece en forma de monocapas en la superficie del frasco de cultivo, a continuación se añade tripsina para despegarlas y se cuentan en un hemocitómetro y se añade medio de cultivo hasta conseguir la concentración de 6 x 10⁵ células por mL.

Para estudiar la citotoxicidad se utilizó el test de extracción del solvente, por el que se obtuvieron extractos mediante agitación a 37 °C durante 90 horas en medio de cultivo EMEM enriquecido con un 10% de suero fetal bovino, de acuerdo a la norma EN-ISO 10993, de piezas de 4 mm de lado y 2 mm de espesor de SiC biomórfico obtenidas de haya, eucalipto y sapeli, tanto recubiertas con una capa de vidrio bioactivo de 25 μm de espesor como sin recubrir. Se han utilizado cubreobjetos redondos de Thermanox (Nalge Nunc Internacional) y discos de policloruro de vinilo (Portex Ltd, Reino Unido) como control negativo y positivo respectivamente. Como materiales de referencia para el SiC biomórfico se usaron aleación Ti6Al4V y piezas del vidrio bioactivo volúmico utilizadas para recubrir por PLD las cerámicas biomórficas. Para las muestras de SiC recubiertas se utilizó como material de referencia Ti de grado médico recubierto mediante PLD con el vidrio bioactivo mencionado antes. Los extractos se diluyeron con EMEM hasta conseguir el 10, 20, 30 50 y 100% de la concentración original. En placas de 96 pocillos se añadieron 0.1 mL de la suspensión de células y se dejaron crecer hasta conseguir una capa confluyente, a continuación se añadieron 0.1 mL de cada extracto. Se prepararon cuatro réplicas por sustrato y concentración de extracto.

Después del período de incubación, la actividad celular se cuantificó usando un kit de proliferación celular I (Cell Proliferation Kit I) de Roche Molecular Biochemicals. Se añadieron 0.01 mL de reactivo MTT en una solución tamponada de fosfatos (PBS) a cada pocillo hasta alcanzar una concentración final de 0.5 mg/mL y se introdujo la placa de cultivos de nuevo en el incubador a 37 °C, 5% de CO₂ y atmósfera humidificada durante 4 horas para conseguir la formación de cristales púrpura de formazán. Para disolver las células y obtener una disolución de los cristales se añadió un detergente, 0.1 mL de una disolución que contiene el 10% de dodecil sulfato sódico en HCl 0.01 M, a cada pocillo. En estas condiciones se dejó la placa de cultivo durante una noche. La absorbancia de las muestras se midió usando un lector de placas Bio-Rad modelo 550. La longitud de onda para medir la absorbancia del formazán es de 570 nm a la que se le restó el valor de la absorbancia medido a 700 nm para eliminar el efecto de posibles trazas de reactivo MTT.

Tras la evaluación de la citotoxicidad mediante el método de extracción de solventes se incubaron células MG-63 sobre sustratos de carburo de silicio biomórfico recubierto y no recubierto con vidrio bioactivo para estudiar la evolución de dichas células sobre la superficie de los materiales. Tres réplicas de cada muestra se incubaron durante 2, 6 y 24 horas en presencia de MG-63. Después de cada período de incubación, las piezas se enjuagaron tres veces con PBS y se fijaron durante 2 horas con 2.5% de glutaraldehído en una disolución amortiguadora 0.1 M de cacodilato sódico. A continuación se lavaron tres veces con PBS y se sumergieron de manera secuencial durante 30 minutos en etanol al 30, 50, 70, 80 y 95 %, y en etanol al 100% durante 1 hora. Cada muestra se sometió al punto crítico de secado poniéndola en contacto con una mezcla de etanol-amilacetato (3:1, 1:1, 1:3), 15 minutos cada una, y a continuación en amilacetato dos veces, durante 15 minutos, finalmente se secaron al vacío. Para su observación mediante SEM se recubrió la superficie de las células con una fina capa de oro.

3. RESULTADOS

En la figura 1 se muestra la microestructura resultante de la infiltración de preformas de carbón provenientes de maderas de haya (Fig. 1 a, b), eucalipto (Fig. 1 d, e) y sapeli (Fig. 1 g, h). Las piezas de SiC biomórfico conservan detalles anatómicos del sistema vascular de las plantas de origen, como

las paredes de las tráqueas y los bordes de las perforaciones que conectan dos elementos traqueales. La estructura de este material se asemeja a la microestructura celular del hueso, lo que podría dar lugar a la migración de células osteogénicas al interior de los poros y la consiguiente formación de nuevo hueso en el interior del implante. Las gráficas c, f, i de la figura 1 muestran la distribución de áreas de los poros para las tres maderas estudiadas sin recubrimiento bioactivo. El haya (Fig. 1 c) tiene un porcentaje de porosidad (Área de los poros/área total) elevada, del 20%, en la que el mayor número de poros se sitúa en tamaños comprendidos entre 500 y 1200 μm^2 con un diámetro de poro medio de 39 μm , descendiendo su número rápidamente a medida que se avanza hacia tamaños mayores. En el caso del eucalipto (Fig. 1 f) el porcentaje de porosidad se ve reducido drásticamente al 7% debido a una disminución considerable del número de poros que se distribuyen irregularmente con muchos de ellos pequeños hasta 600 μm^2 , y con un aumento de frecuencia para poros mayores de 2000 μm^2 . El diámetro medio de poro para el eucalipto se ha situado en 48 μm . Para sapeli (Fig. 1 i), el porcentaje de porosidad se sitúa en torno al 12% con una reducción espectacular del número de poros, pero un aumento notable del tamaño llegando incluso hasta las 13000 μm^2 y con un tamaño de poro medio claramente superior a eucalipto y haya situado en las 111 μm . A la luz de estos resultados, la posibilidad de infiltrar diferentes especies de madera abre todo un abanico de posibilidades de cara a obtener rangos de porosidad diversos que podrían ser aprovechados para

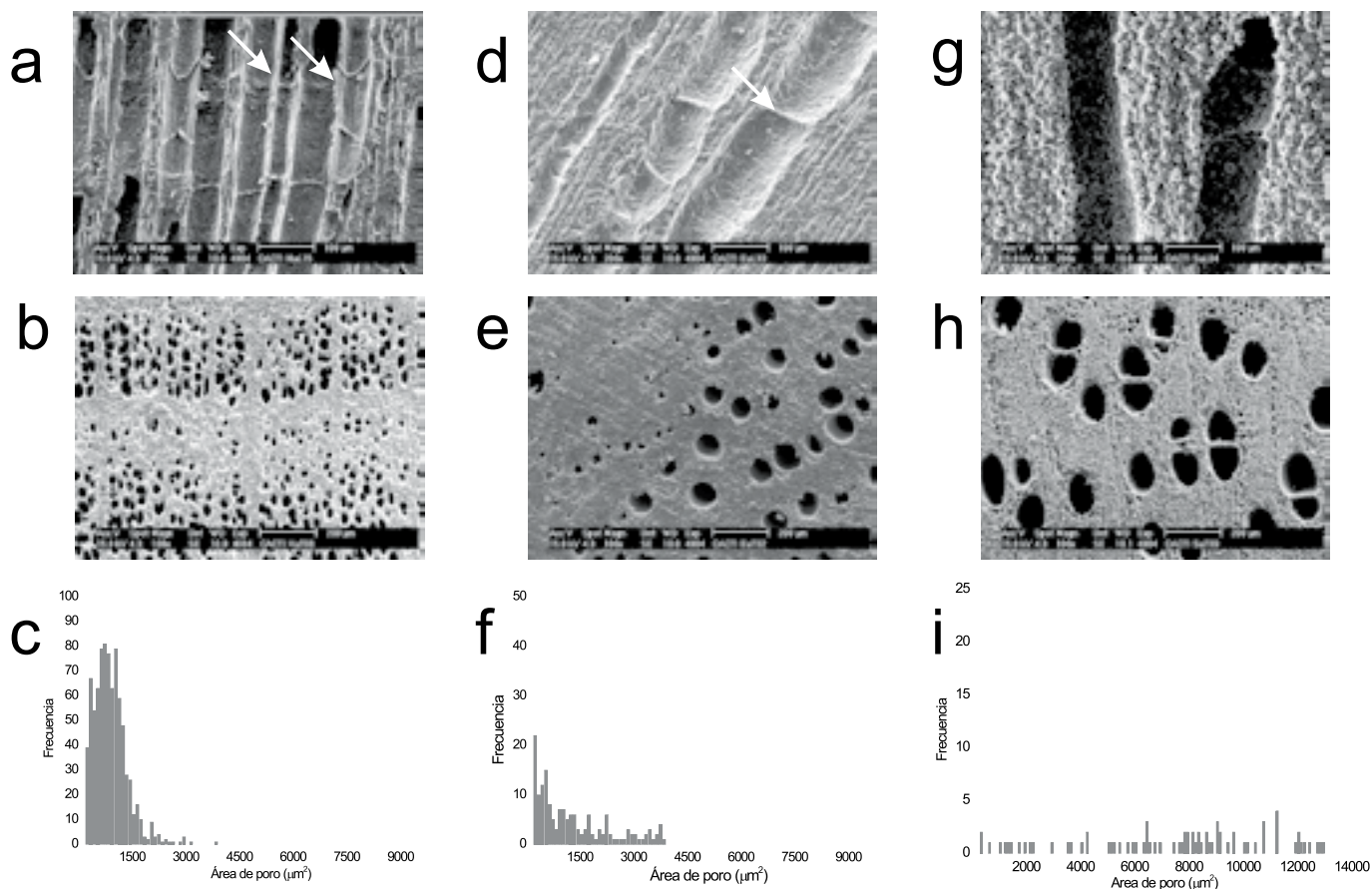


Fig. 1- Micrográficas SEM de piezas de SiC biomórfico obtenidas a partir de maderas originales de haya (a, b), eucalipto (d, e) y sapeli (g, h) y su distribución de áreas de poro (c, f, i) en el mismo orden. Se muestran las secciones longitudinal (a, d, g) y transversal (b, e, h).

obtener piezas implantables en diferentes partes del cuerpo según las necesidades.

Como ya se expuso en la introducción de este trabajo, el SiC biomórfico puede ver incrementadas sus posibilidades de uso en medicina mediante la aplicación sobre su superficie de un depósito de vidrio bioactivo que mejoraría su interacción con los tejidos circundantes. El método de PLD es una técnica óptima para el depósito de capas de vidrio bioactivo sobre SiC biomórfico (4). La bioactividad de las capas producidas se estudió por inmersión de las muestras en SBF. Este líquido emula las condiciones iónicas del plasma sanguíneo y constituye una primera prueba del comportamiento del material cuando se encuentra en un ambiente similar al de los fluidos corporales. Cuando un vidrio bioactivo se sumerge en

este fluido su capa superficial sufre una serie de reacciones que finalizan con la formación de dos capas, una de SiO₂ sobre el vidrio original, y otra de naturaleza apatítica, compuesta por hidroxilapatita carbonatada, sobre la sílica (4,7,11,12). La aparición de esta última es una prueba de la bioactividad de un material, ya que para que se produzca el enlace del material a los tejidos es necesaria su presencia (7). En la figura 2 se presentan las micrográficas SEM y los análisis mediante EDS realizados sobre una pieza de SiC biomórfico tras la deposición de una capa de vidrio bioactivo de 20 μm de espesor (Fig. 2 a, b); y después de la inmersión en SBF durante 72 horas (Fig. 2 c, d). En las micrográficas a y b se aprecia claramente una capa de vidrio y el microanálisis por EDS revela una composición casi idéntica a la del vidrio bioactivo de origen. Se ha producido

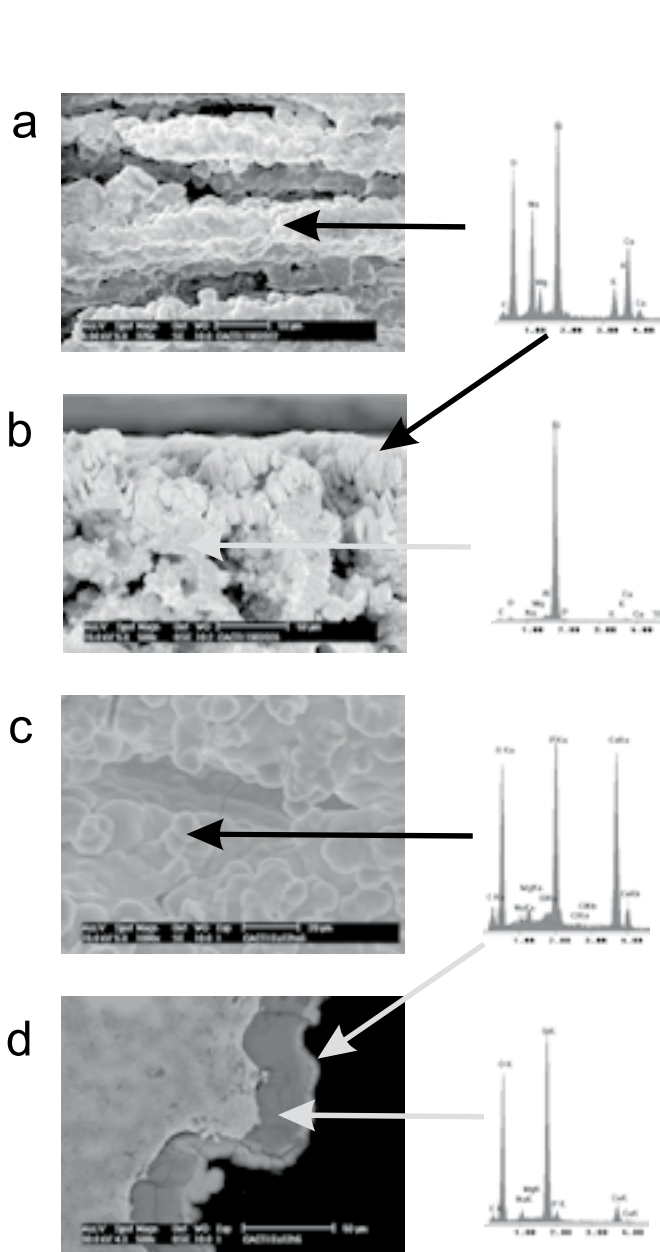


Fig. 2- Micrográficas SEM y análisis EDS de las capas de vidrio bioactivo producidas por PLD sobre SiC biomórfico, (a) vista de la superficie, y, (b) sección. (c) y (d) muestran una vista de la superficie y la sección, respectivamente, de los cambios originados en la capa de vidrio tras la inmersión en SBF durante 72 h.

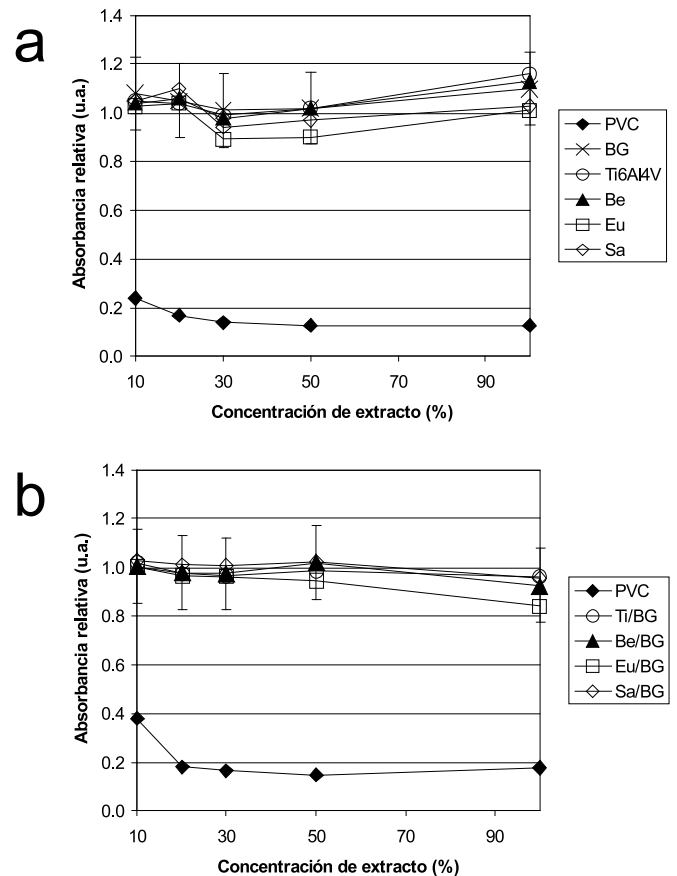


Fig. 3- Actividad celular relativa obtenida a partir del test de extracción de solvente para (a) SiC biomórfico sin recubrir y (b) recubierto con vidrio bioactivo por PLD. PVC: control positivo, BG: vidrio bioactivo, Ti6Al4V: aleación de titanio, Ti: titanio de grado médico; Be, Eu, Sa: SiC obtenido de haya, eucalipto y sapeli; Be/BG, Eu/BG, Sa/BG: SiC proveniente de haya, eucalipto y sapeli recubiertos con BG.

un alisamiento de la superficie rugosa al quedar recubiertos los cristales de SiC del sustrato, pero los canales de los poros no se han taponado, es más, el vidrio ha recubierto también el fondo de los mismos. En el corte transversal (Fig. 2 b) se puede apreciar que la capa está formada por una serie de gránulos unidos que crecen verticalmente.

La inmersión en SBF (Fig. 2 c, d) ha demostrado que la capa de vidrio es bioactiva, ya que se aprecia claramente la formación de una capa y gránulos apatíticos en la superficie del material confirmados por la presencia destacada de picos de

Ca y P en el espectro EDS. Además, es posible detectar debajo de ésta la típica capa de sílice proveniente de la disolución del vidrio que se ha observado para vidrios volúmicos (7,11). Todo ello indica que los recubrimientos de SiC biomórfico dan lugar al proceso bioactivo usual.

El siguiente paso para comprobar la viabilidad del SiC biomórfico como posible implante médico ha consistido en estudiar su comportamiento *in vitro* ante células de osteosarcoma humano de la línea MG-63. Se han estudiado las propiedades citotóxicas del SiC tanto recubierto con vidrio bioactivo como no recubierto mediante el método de extracción de solvente, cuyos resultados se encuentran resumidos en la figura 3, siendo relativos al control negativo de Thermanox. En el caso del SiC biomórfico sin recubrir (Fig. 3 a) se utilizaron como materiales de referencia vidrio bioactivo y Ti6Al4V. Puede verse que los extractos obtenidos a partir de PVC son citotóxicos para todas las concentraciones, lo que valida el método utilizado. Las referencias de vidrio y aleación de titanio presentan un comportamiento muy semejante al del control negativo. El mismo resultado se obtiene para el SiC proveniente de las tres maderas. Tan sólo cabe citar un pequeño descenso de la actividad celular para eucalipto y sapeli con concentraciones de 30 y 50% que desaparece para el 100%. Sin embargo, ninguna de las diferencias se encuentra fuera del rango estadístico. Para las muestras recubiertas (Fig.

Estas pruebas demuestran que el SiC biomórfico no ejerce efectos tóxicos sobre las células MG-63 lo que constituye un nuevo paso en el camino para obtener un nuevo tipo de implante ligero, resistente mecánicamente y biocompatible.

Finalmente, la proliferación y adhesión de las células MG-63 sobre el SiC biomórfico recubierto y no recubierto se estudiaron mediante SEM a tiempos de cultivo de 3, 6 y 24 horas (Fig. 4). Los resultados para sustratos recubiertos y no recubiertos del mismo precursor fueron muy similares, por lo que en aras de una visión más amplia de las posibilidades de estos materiales se muestran dos sustratos diferentes: uno de haya sin recubrir cortado transversalmente y otro de eucalipto recubierto cortado longitudinalmente. En el caso del sustrato proveniente de haya sin recubrir, para el menor tiempo (Fig. 4 a) se aprecia una baja población celular que en su mayoría está formada por células con forma esférica y gran profusión de filopodios, con un escaso número de células extendidas sobre la superficie del sustrato. Esto es debido a una elevada porosidad que provoca que muchas de las células del cultivo hayan migrado al interior de los poros. Además, su morfología denota que las mismas se encuentran en estado mitótico y con gran capacidad de movimiento. Con tres horas más de cultivo (Fig. 4 b), el número de células ha aumentado incluso en las proximidades de los poros y su morfología es preferentemente plana, con aparición de extensiones citoplasmáticas en forma de lamelipodios lo que indica una adhesión al material y una comunicación intercelular mayores. Al cabo de un día de cultivo (Fig. 4 c), las células han formado prácticamente una monocapa que cubre casi por completo los poros del material. Para el sustrato proveniente de eucalipto y recubierto con vidrio bioactivo se produce una evolución muy semejante aunque ya a las tres horas de cultivo (Fig. 4 d) presenta numerosas células adheridas y una mayor población debido a una porosidad menor, lo que permite que crezcan más células en la superficie. Tras 6 horas (Fig. 4 e) las células en estado mitótico ya no son tan abundantes y el material está recubierto casi al completo por una monocapa. Transcurridas 24 horas (Fig. 4 f), la formación de la monocapa se ha completado y algunas células han extendido sus lamelipodios a través de las depresiones de los poros longitudinales. Estos resultados confirman la toxicidad nula del SiC biomórfico y de éste recubierto con vidrio bioactivo. Ambos materiales presentan un ambiente favorable para el desarrollo del ciclo vital de células similares a las óseas que pueden encontrarse en organismos vivos. La gran adhesión de estas células a estos nuevos materiales y su migración al interior de su sistema poroso son una confirmación, aunque preliminar, de la posibilidad de crecimiento y unión de tejido vivo al material.

4. CONCLUSIONES

Se ha realizado un estudio morfológico del SiC biomórfico obtenido a partir de diferentes maderas. El proceso de fabricación permite conservar detalles anatómicos de la madera como su estructura porosa. La elección del material de partida permite obtener SiC biomórfico con una porosidad total y una distribución del tamaño de poro adecuadas para la aplicación deseada.

Además se ha evaluado la viabilidad *in vitro* del SiC biomórfico como tal y recubierto de una capa de vidrio bioactivo depositada por PLD. El recubrimiento de vidrio inmerso en fluido fisiológico ha desarrollado las reacciones bioactivas normales con la formación de capas de sílice y

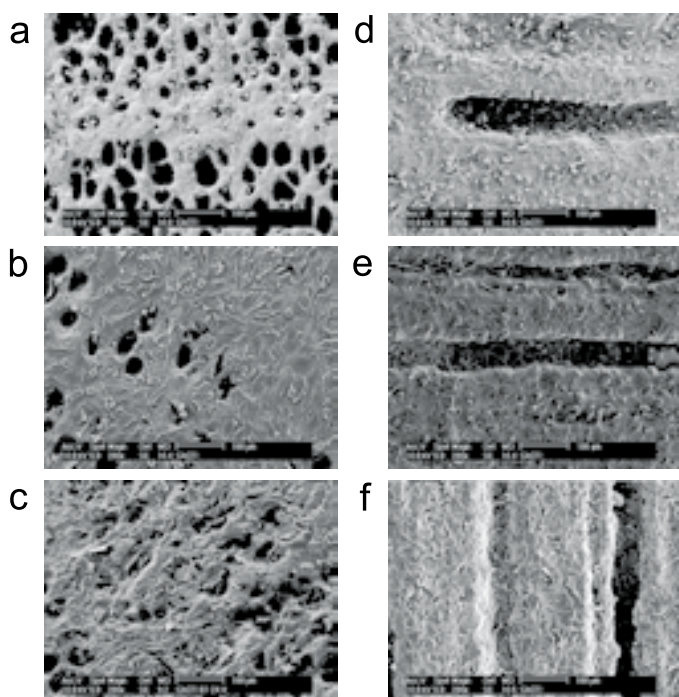


Fig. 4- Micrografía SEM en la que se muestra la proliferación y la adhesión de las células MG-63 tras 3 (a,d), 6 (b,e) y 24 horas (c,f) de cultivo en SiC proveniente de haya sin recubrir (a,b,c) y SiC de eucalipto recubierto con una capa de vidrio bioactivo de 20 µm de espesor (d,e,f).

3 b) se utilizó Ti de grado médico como material de referencia. Tanto para el Ti como para el SiC el comportamiento ha sido muy parejo al del control negativo de Thermanox, aunque para eucalipto se produjo un ligero descenso de la actividad para concentraciones de extracto de 50 y 100%, pero una vez más las diferencias no son estadísticamente significativas.

apatita que posibilitan el enlace de tejidos vivos. Ambos materiales no presentan efectos citotóxicos sobre las células de osteosarcoma de la línea MG-63 como se demostró mediante el test de extracción de solvente. Además, esta línea celular desarrolla su ciclo vital con normalidad sobre ambos materiales y se adhiere sobre el mismo formando monocapas de células, colonizando asimismo el interior de la estructura porosa.

Estos resultados son un primer paso que confirma la posibilidad de obtención de nuevos materiales basados en SiC biomórfico destinados a la producción de implantes médicos con necesidades de carga mecánica y altamente compatibles en un entorno como son los fluidos corporales.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia (MAT2001-3434, MAT2004-02791) y la Xunta de Galicia (PGIDIT03TMT30101PR).

Los autores desean agradecer a Jesús Méndez y José Benito Rodríguez su asistencia para los estudios SEM y la evaluación de la porosidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. L. L. Hench, J. Wilson. «Introduction» pp. 1-24 en *An introduction to bioceramics*. Eds. L. L. Hench y J. Wilson. World Scientific Singapore 1993.
2. T. V. Thamaraiselvi, S. Rajeswari. «Biological Evaluation of Bioceramic Materials-A Review». *Trends Biomater. Artif. Organs*, 18 [1] 9-17 (2004).
3. A. A. Campbell. «Bioceramics for Implant Coatings». *Mater. Today*, 6 [11] 26-30 (2003).
4. P. González, J. Serra, S. Liste, S. Chiussi, B. León, M. Pérez-Amor, J. Martínez-Fernández, A. R. de Arellano-López, F. M. Varela-Feria. «New Biomorphic SiC Ceramics Coated with Bioactive Glass for Biomedical Applications». *Biomaterials* 24 [26] 4827-4832 (2003).
5. F. M. Varela Fera, A. R. de Arellano López, J. Martínez Fernández. «Fabricación y Propiedades del Carburo de Silicio Biomórfico: Maderas Cerámicas». *Bol. Soc. Esp. Ceram. V. 41* [4] 377-384 (2002).
6. P. González, J. P. Borrajo, J. Serra, S. Liste, S. Chiussi, B. León, K. Semmelmann, A. de Carlos, F. M. Varela-Feria, J. Martínez-Fernández, A. R. de Arellano-López. «Extensive Studies on Biomorphic SiC Ceramics properties for Medical Applications». *Key Eng. Mater.* 254-256, pp 1029-1032 (2004).
7. L. L. Hench, Ö. Andersson. «Bioactive Glasses». pp. 41-62 en *An introduction to bioceramics*. Eds. L. L. Hench y J. Wilson. World Scientific Singapore 1993.
8. R. Teghil, L. D'Alessio, D. Ferro, S. M. Barinov. «Hardness of Bioactive Glass Film Deposited on Titanium Alloy by Pulsed Laser Ablation». *J. Mater. Sci. Lett.* 21 [5] 379-382 (2002).
9. J. Serra, P. González, S. Chiussi, B. León, M. Pérez-Amor. «Processing of Bioglass Coatings by Excimer Laser Ablation». *Key Eng. Mater.* 192-195, pp 635-638 (2001).
10. H-M. Kim, T. Miyazaki, T. Kokubo, T. Nakamura. «Revised Simulated Body Fluid». *Key Eng. Mat.* 192-195, pp 47-50 (2001).
11. J. P. Borrajo, S. Liste, J. Serra, P. González, S. Chiussi, B. León, M. Pérez-Amor, H. O. Ylänen, M. Hupa. «Influence of the Network Modifier Content on the Bioactivity of Silicate Glasses». *Key Eng. Mater.* 254-256, pp 23-26 (2004).
12. H. Takadama, H-M. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura. «X-ray photoelectron spectroscopy study on the process of apatite formation on a sodium silicate glass in simulated body fluid». *J. Am. Ceram. Soc.* 85 [8] 1933-1936 (2002).

Recibido: 14.02.05

Aceptado: 14.06.05

