



Superficies Modificadas Mediante Polimerización por Plasma para Cocultivos de Modelos Hepáticos

O. Ramírez-Fernández¹

R. Godínez¹

J. Morales²

L. Gómez-Quiroz³

M.C. Gutiérrez-Ruiz³

E. Zúñiga-Aguilar¹

R. Olayo²

¹Departamento de
Ingeniería Eléctrica

²Departamento de Física

³Departamento de
Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma
Metropolitana, Unidad
Iztapalapa, Apdo. Postal
55-534, Iztapalapa,
México.

RESUMEN

El desarrollo de hígados bioartificiales, busca crear modelos biológicos que suplanten la función hepática. En años recientes se han obtenido mejoras a los modelos al utilizarlos en cocultivo con células parenquimales y células estructurales. El anclaje celular a la superficie es fundamental para generar un cultivo celular, por ello se emplean materiales biocompatibles o polímeros biocompatibles sintetizados con la polimerización por plasma.

En este trabajo se presenta una superficie de cultivo de Polipirrol dopado con Iodo (Ppy-I) utilizando polimerización por plasma para un cocultivo de hepatocitos de la línea celular HepG2 con células estelares inmortalizadas, conocidas como células Ito. Este cocultivo se comparó con una caja de cultivo estándar. Se analizó la morfología y proliferación celular al cabo de 9 días de cultivo. Asimismo, se midió la proteína total secretada al sobrenadante, los resultados indican que la proteína se incrementa al utilizar la superficie con Ppy-I con respecto al cocultivo con superficie estándar, obteniéndose máximos de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente. No se observaron diferencias morfológicas ni de proliferación entre los cocultivos con superficie Ppy-I y estándar. Concluimos que el cocultivo celular hepático sobre una superficie con Ppy-I estimula la producción de proteína en los hepatocitos, resultado que mejoraría el desempeño de los hígados bioartificiales.

Palabras clave: polipirrol, hepatocitos, células estelares, modelo hepático, cultivo celular, hígado bioartificial.

Correspondencia:
O. Ramírez-Fernández
Departamento de Ingeniería
Eléctrica, Universidad
Autónoma
Metropolitana-Iztapalapa,
Apdo. Postal 55-534,
Iztapalapa, México.

Fecha de recepción:
26/Octubre/2012

Fecha de aceptación:
18/Diciembre/2012

ABSTRACT

The aim of the development of Bioartificial livers (BAL) is to create biological models that imitate the liver function. In recent years improvements in these models have been obtained by using cocultures of structured and parenchymal cells. The cell adhesion is fundamental to generate a cell culture, for this reason, we used biocompatible materials or biocompatible polymers synthesized by plasma discharge.

In this work we used a polypyrrole doped with iodine (Ppy-I) cell culture surface, synthesized by plasma glow discharge to cultivate hepatocytes of the cell line HepG2 with immortalized stellate or Ito cells. These cocultures were compared to a standard surface cell culture. We analyzed the morphology and cell proliferation during 9 culture days. Also, we analyzed the whole supernatant protein secreted, the results show an increase in the secreted protein when we used the Ppy-I in comparison to the standard surface, we obtained maximums of 8 $\mu\text{g/ml}$ and 6 $\mu\text{g/ml}$ respectively. We didn't observed morphological differences between the Ppy-I surface and the standard surface. We conclude that the hepatic cell cocultures on a Ppy-I surface, stimulates the hepatic secreted protein. These results can be used to improve the performance of BAL.

Keywords: polypyrrole, hepatocytes, stellate cells, hepatic model, cell culture, bioartificial liver.

INTRODUCCIÓN

Actualmente múltiples tipos celulares se cultivan con éxito sobre andamios de distinta naturaleza con el objetivo de regenerar hueso, cartílago, vasos sanguíneos o tráquea, entre otros [1-4]. Asimismo, este tipo de cultivo celular está suscitando un enorme interés en los procesos de desarrollo de nuevos fármacos, puesto que, gracias a una mejor simulación de las condiciones fisiológicas, permite aumentar significativamente la fiabilidad de los resultados de fármacos evaluados en pruebas *in vitro* con cultivos celulares [5]. Por otra parte, estudios recientes han mostrado que los cultivos celulares son más eficientes al sembrar las células en cocultivo con células no parenquimales, probablemente por la liberación de sustancias y mensajeros químicos secretadas por dichas células no parenquimales dentro de un mismo ambiente de cultivo celular

[6]. Se decidió utilizar líneas celulares, debido a que son modelos biológicos que brindan la ventaja de ser fácilmente proliferables, sin tener que utilizar animales. Una vez bien caracterizado el protocolo, se pueden realizar las pruebas con cultivos primarios [2].

Algunos de los materiales más utilizados en el cultivo de células son los polímeros biodegradables tales como PGA (ácido poliglicólico), PLLA (ácido poliláctico) y sus copolímeros PGA-PGLA (ácido poliláctico-ácido poliglicólico). Esta familia de polímeros tiene el potencial de favorecer el crecimiento celular *in vitro* además de que se han implantado con éxito [7].

Estos andamios ya bien caracterizados en el cultivo celular y su posterior implantación *in vivo*, pueden ser modificados en su superficie para potencializar sus propiedades de adherencia celular sin interferir en las

características químicas del material base para tener mejores propiedades de tejido [8]. Diversos autores abordan este tema destacando que la modificación de la superficie de los materiales mejora la proliferación celular, el anclaje y una mejor respuesta fisiológica del cultivo celular [9-11].

Para modificar la superficie de un material empleado en el cultivo celular se utilizan técnicas de polimerización por plasma, debido a que se obtienen polímeros no lineales, con múltiples grupos funcionales en su estructura lo que favorece una mejor interacción de la membrana celular con la superficie para obtener una mejor adherencia celular, y por lo tanto, una mejor proliferación celular [12].

La polimerización por plasma es un proceso en el cual los monómeros orgánicos son polimerizados mediante bajas presiones y descargas de gas ionizado que promueven la polimerización tan peculiar de estos procesos al depositarse sobre las superficies, obteniendo además materiales completamente esterilizados debido a las reacciones químicas [13]. Las especies generadas en el plasma son aptas para producir modificaciones físicas y reacciones químicas en la superficie de los sustratos sometidos a la acción del plasma [14]. El tipo de modificación o reacción depende de la naturaleza de los gases del plasma, el nivel de energía y la naturaleza del sustrato [15].

El Polipirrol dopado con yodo (PPy-I) ha mostrado buena biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo* para el uso de andamios en bioingeniería, implantes en medula espinal y para generar cultivos celulares tridimensionales. Por lo que es posible utilizar una superficie modificada superficialmente con PPy-I para generar un cocultivo celular con 2 o más tipos celulares que puedan crecer en un mismo ambiente de cultivo, para potencializar las funciones fisiológicas del cultivo celular [16,17].

En este trabajo se evalúan las superficies de cultivo celular estándar y superficies tratadas con PPy-I, donde presentamos cocultivos celulares con modelos biológicos de células del tejido hepático como la línea celular HepG2 y la línea estelar inmortalizada Ito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se modificó la superficie de un cubreobjetos por medio de la polimerización por plasma utilizando como monómeros pirrol y Iodo. El cubreobjetos se empleó como superficie de sembrado celular para crear un modelo hepático basado en el cocultivo celular de hepatocitos y células estelares. Se evaluó contra un plato de cultivo estándar que la superficie modificada no afectara la morfología y proliferación celular. Para valorar su desempeño fisiológico, se midió la producción de proteína total secretada al sobrenadante del cocultivo estándar y del cocultivo sobre la superficie tratada con Ppy-I.

Cultivos celulares

Se utilizaron hepatocitos de la línea celular HepG2 (ATCC HB8065), utilizando medio de cultivo Williams Tipo E (Gibco 12551) al 90%, suero fetal bovino (Gibco 16000) al 8%, Antibiótico y antimicótico (Gibco 15240) 100 M al 1% y L-Glutamina (Sigma G-1517) 0,2 M al 1%. Las células Ito inmortalizadas fueron donadas por la Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz del Departamento de Fisiología Celular de la UAM Iztapalapa, utilizando medio de cultivo DMEM (Gibco 12551) al 90%, suero fetal bovino (Gibco 16000) al 8%, Antibiótico y antimicótico (Gibco 15240) 100 M al 1% y L-Glutamina (G-1517 Sigma) 0,2 M al 1%. Las células fueron proliferadas en un ambiente controlado a 37° C y una mezcla de gases al 5% de CO₂ y 95% de aire en una incubadora de CO₂.

Polimerización por plasma

La superficie de los cubreobjetos con PPy-I se prepararon por polimerización por plasma con el siguiente protocolo: dentro del reactor de vacío se empleó una presión de (9×10^{-2} Torr) medida con un sensor de vacío (Edwards Active Gauge Control). Se utilizó una potencia de 50 watts reales, obtenidos de una fuente de Radio frecuencia a 13.5 MHz (Dressler Cesar RF). Como monómeros empleamos Pirrol (98% Sigma-Aldrich) y Iodo (98% Sigma-Aldrich). Se polimerizó durante 20 minutos alternando 4

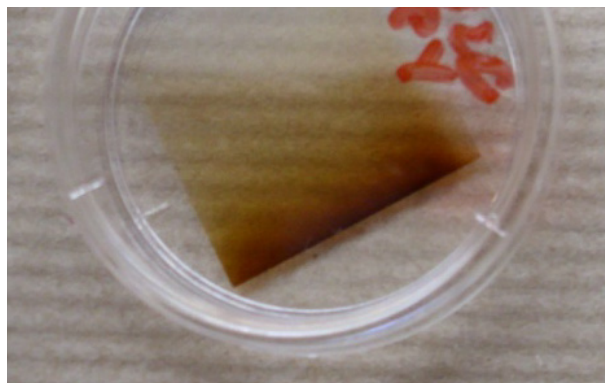


Fig. 1. Cubreobjetos recubierto con polipirrol yodo, la parte sombreada del cubreobjetos es la parte donde se ha depositado el PPy-I.

minutos con pirrol y Iodo, 6 minutos con pirrol, 4 minutos con pirrol y yodo y finalmente 6 minutos con pirrol. La superficie del material modificado con PPy-I se muestra en la Fig. 1.

Sembrado de células

Para los cocultivos se utilizó una densidad de sembrado de 2.25×10^5 de células Ito (paso 6) y 5×10^5 de células HepG2 (paso 85), las células fueron contadas con una cámara de Neubauer. Esta selección se decidió con base en la estructura no parenquimal de las células Ito dentro de un hígado *in vivo* estando en mayor proporción la cantidad de hepatocitos.

Se sembraron las células en el plato de cultivo de manera separada como se muestra en la Fig. 2. Dentro de la caja de cultivo, en un extremo se sembraron las células HepG2 y en el extremo opuesto, las células Ito. Con esto se mantienen separados los 2 tipos celulares en una misma caja de cultivo hasta que estén bien anclados a la superficie. Luego de 4 horas de cultivo, se agregaron 4 mililitros del medio de cultivo combinado, para tener el crecimiento celular dentro de un mismo ambiente.

Se utilizó una mezcla de medios de cultivo Williams tipo E suplementado y D-MEM suplementado en una proporción 1:1 como se muestra en la Tabla 1, Los medios Williams y D-MEM son los empleados para hepatocitos y células Ito respectivamente. Se sembraron los cocultivos en dos tipos de superficies por duplicado: en el primer caso se empleó un plato

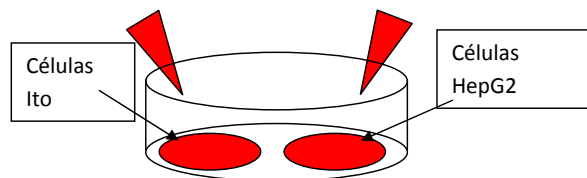


Fig. 2. Esquema de Micro sembrado de células HepG2 e Ito de manera separada para formar un cocultivo.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo empleado en el cocultivo celular.

Soluciones	Concentraciones (M)	Porcentaje (%)
Medio de cultivo D-MEM	1	45
Medio de cultivo Williams Tipo E	1	45
10% suero fetal bovino (FBS)	1	8
1% de antibióticos	100	1
L-Glutamina	0.2	1

de cultivo estándar de 35 mm de diámetro por 10 mm de altura, con un área de crecimiento de 8cm^2 con recubrimiento de lisina (Corning #430165); en el otro, se empleó un cubreobjetos que fue polimerizado con polipirrol dopado con yodo (PPy-I), que se encontraba estéril debido a que al ser polimerizado por plasma, el gas ionizado funciona como esterilizador; y antes de sembrar el cocultivo, el cubreobjetos fue puesto durante 2 días debajo de luz ultravioleta, para tener una superficie óptima.

Cuantificación de proteína

Para determinar las proteínas totales en el sobrenadante, se utilizó el kit de análisis de proteína BCA (ácido bicínico) (Thermo Scientific 23225), que trabaja por medio

de colorimetría, a 562 nanómetros de la longitud de onda. La curva estándar fue obtenida inicialmente usando albúmina sérica bovina (BSA) a diversas concentraciones proporcionadas por el kit. Se tomaron 0.5 ml de sobrenadante de los platos de cultivo a diferentes días, las muestras fueron puestas en una placa de 96 pozos y se procedió a medir las concentraciones por duplicado, en un detector multimodal de placas DTX 880 (Beckman Coulter).

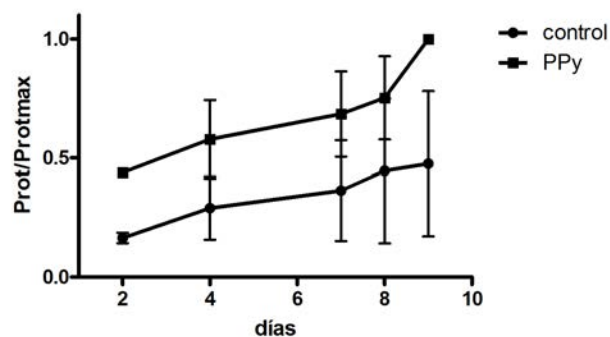
Análisis estadístico

Los datos de cuantificación de proteína, fueron analizados en el programa GraphPad Prisma Versión 4. Donde se utilizó una T de student normalizada para el análisis de resultados. Considerando una $p < 0.05$ estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Imágenes de las superficies de cultivo

En la Fig. 3, se muestra la evolución del cocultivo celular, después de varios días de cultivo sobre la placa de cultivo estándar y sobre la superficie modificada superficialmente con PPy-I. Se muestra el cultivo celular a los días 2, 3, 4 y 5. Se puede apreciar una mayor proliferación celular conforme aumentan los días de cultivo celular y la respectiva separación de acuerdo a su morfología celular para ambos casos. Podemos observar un cumulo de células hepáticas, siendo rodeado por células estelares, que se muestran de forma alargada(B). Vemos los cúmulos de células hepáticas de color oscuro debido a que están formando montículos y las células estelares rodeándolos (D). Se observa un crecimiento de células hepáticas, siendo rodeado por células estelares, que se muestran como figuras alargadas (F). Vemos los cúmulos de células hepáticas y las células estelares creciendo uniformemente sin la formación de cúmulos y las partes oscuras muestran pedazos de la capa delgada de PPy-I (H).



Gráfica 1. Con círculos se muestra la producción de proteína por células sembradas en superficie estándar. Con cuadros, producción de proteína por células sembradas sobre una superficie modificada con PPy-I. Los datos fueron normalizados con respecto al valor máximo de proteína en el Ppy-I de $8\mu\text{g/ml}$.

Las imágenes se muestran únicamente hasta el día 5, debido a que para el resto de los días se tiene una confluencia total de las superficies de cultivo y no resultan significativas.

Cuantificación de proteína

Por último se midió la cantidad de proteínas totales secretadas al medio de cultivo a diferentes días del cocultivo celular. En el cocultivo sobre el cubreobjetos con superficie modificada con PPy-I, se obtuvo una mayor producción de proteínas totales en comparación a los cultivos realizados sobre la caja estándar, tal como se muestra en la Gráfica 1. Las mediciones se realizaron por duplicado ($n = 2$). Las líneas verticales indican la desviación estándar. Las diferencias entre el control y el experimental fueron significativas ($p < .05$)

Conteo celular

Después de 9 días de cocultivo celular se obtuvieron proliferaciones celulares muy similares para los cocultivos sobre las superficies estándar y modificada con PPy-I como se muestra en la Tabla 2.

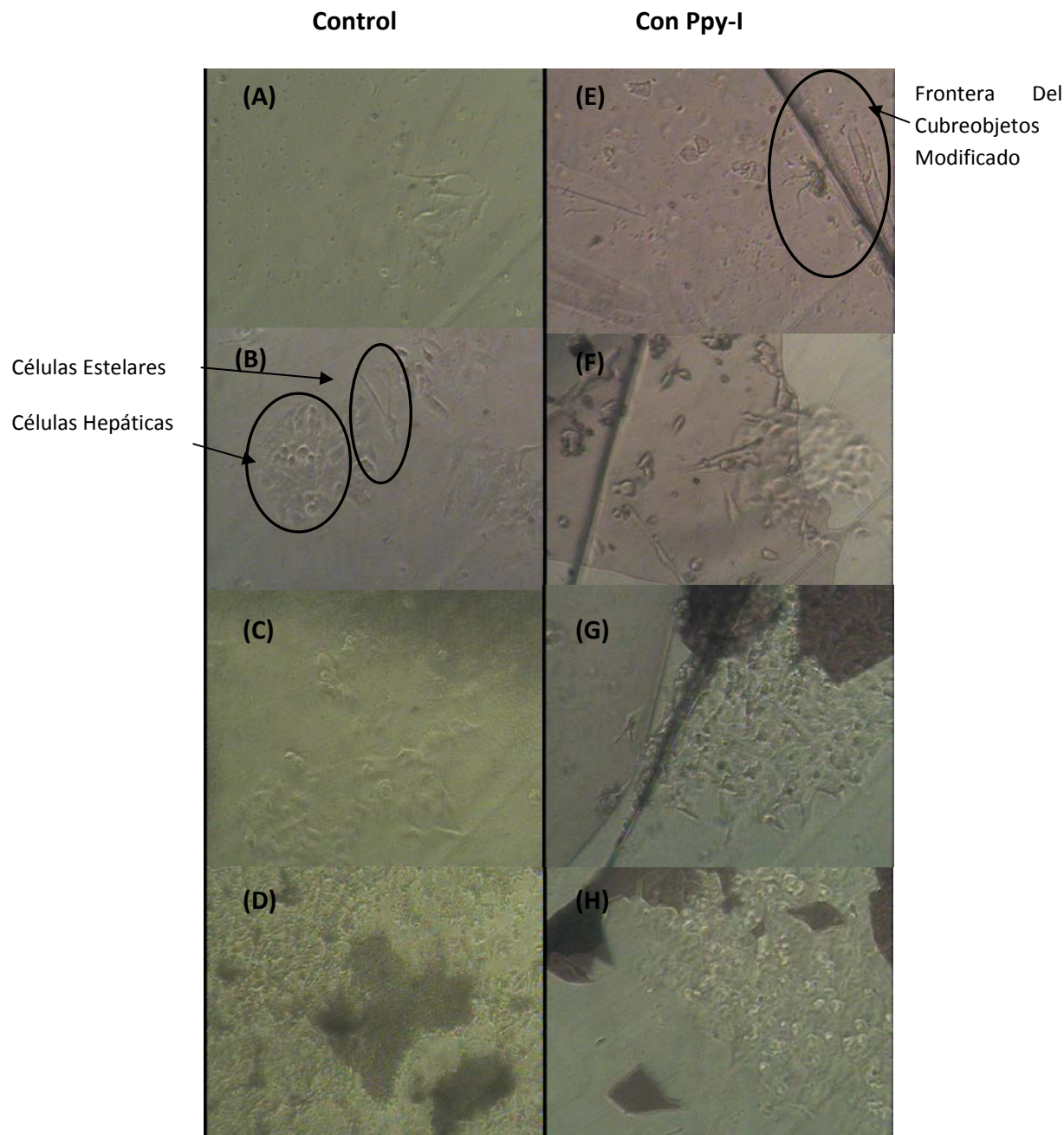


Fig. 3. Co-Cultivo celular de células HepG2 y células Ito. Células en placa estándar control (A, B, C Y D) y sobre la placa con recubrimiento de Ppy-I (E, F, G Y H) a los días 2, 3, 4 y 5 respectivamente. Aumento 100x.

Tabla 2. Conteo celular de los cocultivos sobre superficie estándar y tratada con PPy-I. Los resultados fueron similares en ambas superficies.

	Células al comienzo del experimento	Células al término del experimento
Superficie control	7.25×10^5	1.1×10^6
Superficie con PPy-I	7.25×10^5	1.15×10^6

DISCUSIÓN

De manera tradicional el cultivo celular de las células HepG2 e Ito se realiza por separado en diferentes cajas de cultivo, o sea, sin mezclar ambos tipos celulares; además, para su cultivo, se emplean protocolos diferentes [7]. Nosotros realizamos un cocultivo con ambos tipos celulares ya que se ha reportado una mejor actividad fisiológica de los hepatocitos al momento de ser sembrados con células no parenquimales, esto es, se observan efectos cooperativos [18]. También podemos observar, en las figs. 3B y 3F, que desde el día 3 ya se están mezclando las células, a pesar de haber sido sembradas por separado para comenzar a tomar la estructura morfológica típica de encapsulados de células hepáticas rodeadas de células estelares, tal como se puede observar en la Fig. 3G [8]. Los cocultivos realizados hasta la fecha, emplean un único medio de cultivo, normalmente el que más nutrientes contiene en su composición [10]. Nosotros empleamos medios de cultivo combinados obteniendo buenos resultados. No se tenían resultados de proliferación de ambos tipos celulares tan eficientes como al mezclar los medios.

Como se puede observar en las imágenes de la Fig. 3, el cocultivo celular sembrado sobre una superficie modificada con PPy-I no afecta la morfología del cocultivo celular de acuerdo a los resultados control, ya que son semejantes a los cultivos sembrados sobre superficies de cultivo estándar [11]. De las imágenes obtenidas podemos inferir que las células sembradas tienden a organizarse morfológicamente de manera que recuerda su organización en el tejido hepático [2]. Esto a pesar de que inicialmente se sembraron las células de manera separada (en la misma caja de cultivo). Después que las células se anclaron a las cajas de cultivo, comienzan a migrar y a comportarse de la manera descrita.

Aunque se tienen antecedentes del cultivo de células HEPG2 sobre superficies tratadas con polipirrol [11], no así para el caso de las células Ito. En este trabajo se muestra que la proliferación celular en el cocultivo no se ve afectado por la presencia del PPy-I en la

superficie donde fueron sembradas.

Aunque las imágenes muestran una densidad celular parecida en cocultivos estándar y en superficies tratadas con PPy-I, la producción de proteína fue superior en este último caso. Ya que las mediciones fueron realizadas en el medio suplementado con suero fetal bobino y aun así podemos observar diferencias significativas en la producción de proteínas totales, debido a la albúmina y proteínas de enlace secretadas por los hepatocitos. Este resultado es clave cuando se desea que las células hepáticas muestren un mejor desempeño fisiológico, ya que tenemos cantidades celulares similares en ambos cocultivos, pero un desempeño diferente en la producción proteínica; por lo que podemos inferir que una superficie tratada con PPy-I, fomenta una mejor fisiología celular comparada con una superficie de cultivo estándar. Este comportamiento se puede asociar a la diversidad química del PPy-I que le permite interactuar con diferentes tipos de proteínas y obtener un mejor anclaje celular, dando como resultado una mayor funcionalidad [8,11,17].

Actualmente se busca realizar cultivos volumétricos en los cuales las células son cultivadas in vitro sobre andamios dentro de hígados bioartificiales [19]. En estos sistemas se han reportado crecimientos volumétricos más efectivos en comparación con un cultivo estático y tiempos de cultivo más prolongados obteniendo una mayor proliferación celular [18,19]. Este tipo de cultivo celular está suscitando un enorme interés ya que mejora los modelos biológicos que nos ayudan a comprender los mecanismos celulares de los tejidos [20].

CONCLUSIONES

Se obtuvo un cultivo celular mixto de células estelares y hepatocitos sembradas sobre una superficie modificada con PPy-I. Nuestras imágenes indican que la superficie tratada con PPy-I no afecta la morfología celular de las células HepG2 e Ito.

El conteo celular muestra que son similares las superficies para la proliferación celular. Los datos indican que el PPy-I favorece la producción de proteína total. No se observaron efectos

tóxicos.

La presencia de Ppy-I en un cocultivo celular promueve la fisiología celular de un cultivo hepático, para obtener un mejor funcionamiento celular.

Los modelos de hígados artificiales en la actualidad [18-20], emplean únicamente células hepáticas en lugar de emplear un modelo más complejo en cuanto a cooperación celular para mejorar su desempeño. Los cocultivos y superficies tratadas pueden mejorar significativamente su desempeño, por lo que ya tenemos andamios y condiciones de cultivo celular aptas para utilizarse dentro de un biorreactor de un hígado Bioartificial.

AGRADECIMIENTOS

Los autores queremos agradecer a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), al CONACYT y al ICyT-DF (PIUTE 10-63,276/2010), por su colaboración para llevar a cabo este trabajo.

REFERENCIAS

- Geetha M., Singh A.K., Asokamani R., Gogia A.K. (2009) "Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review" *Progress in Materials Science* 54(3), 397-425.
- Lanza R.P., Langer R., Vacanti J. (2000) "Principles of tissue engineering." Ed. Academic Press.
- Du Y, Han R, Wen F, Ng San San S, Xia L, Wohland T, Leo HL, Yu H. (2008) "Synthetic sandwich culture of 3D hepatocyte monolayer". *Biomaterials*. 29(3): 290-301.
- Cordero J. (2009) "Biomateriales, actualizaciones en cirugía ortopédica y traumatología". 3ª Ed., Masson.
- Moosvi S. R., Day R.M. (2009) "Bioactive glass modulation of intestinal epithelial cell restitution" *Acta Biomaterialia* 5: 76-83.
- Ishii Y., Saito R., Marushima H., Ito R., Sakamoto T., Yanaga K., (2008) "Hepatic reconstruction from fetal porcine liver cells using a radial flow bioreactor", *World J Gastroenterology* 14(17): 2740-2747.
- Shoufeng Y., Kah-Fai L., Zhaohui D., Chee-Kai C. (2001) "The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors" *Tissue Engineering* 7(6): 679-689.
- Cruz G., Mondragon-Lozano R., Diaz-Ruiz a., Manjarrez J., Olayo R, Salgado-Ceballos H., Olayo M.G., Morales J., Alvarez-Mejía L., Morales A., Méndez-Armenta M., Plascencia N., Ríos C. (2012) "Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord transection." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 23(10): 2583-2592.
- Hamazaki, K., Doi, Y., and Koide, N. (2002) "Microencapsulated multicellular spheroid of rat hepatocytes transplanted intraperitoneally after 90% hepatectomy." *Hepatogastroenterology*, 49: 1514-1516.
- Dvir-Ginzberg, M., Gamlieli-Bonshtein, I., Agbaria, R., and Cohen, S. (2003) "Liver tissue engineering within alginate scaffolds: effects of cell-seeding density on hepatocyte viability, morphology, and function." *Tissue Engineering* 9: 757-766
- Morales Corona J., Pérez Tejada E., Montiel Campos R., Vázquez Torres H., Olayo R., Gómez Quiróz L. E., Gutiérrez Ruiz M.C., Olayo González M. G., Cruz Cruz G. J. (2008) "Modificación superficial por plasma aplicada a biomateriales." *La Física Biológica en México: Temas Selectos* 2, Cap. 8, 195-205. Editado por el Colegio Nacional.
- Biederman, H., Slavinska, D. (2000) "Plasma polymer films and their future prospects" *Surface and Coatings Technology* 125(1-3): 371- 376
- Zhang Z., Roy R., Dugre F. J., Tessier D. Dao L. H. (2001) "*In vitro*

- biocompatibility study of electrically conductive polypyrrole-coated polyester fabrics.” *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 57(1): 63-71.
14. Jiang X., Tessier D., Dao L. H. Zhang Z. (2002) “Biostability of electrically conductive polyester fabrics: an *in vitro* study.” *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 62(4): 507-513.
 15. Shi G., Rouabhia M., Wang Z., Dao L. H. And Zhang Z. (2004) “A novel electrically conductive and biodegradable composite made of polypyrrole nanoparticles and polylactide” *Biomaterials* 25(13): 2477-2488.
 16. Wang J., Neoh K. G., Kang E. T., (2004) “Comparative study of chemically synthesized and plasma polymerized pyrrole and thiophene thin films” *Thin Solid Films* 446: 205-217
 17. Olayo R., Ríos C., Salgado-Ceballos H., Cruz G. J., Morales J., Olayo M. G., Álvarez A. L., Lozano R., Morales J. C., Díaz-Ruiz A. (2008) “Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole and polyethylene glycol obtained by plasma” *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 19 (2): 817-826.
 18. Morelli S., Salerno S., Piscioneri A., Campana C., Drioli E. and De Bartolo L. (2010) “Membrane bioreactors for regenerative medicine: an example of the bioartificial liver” *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* 5: 146-159
 19. Allen, J. W., Hassanein, T. and Bhatia, S. N. (2001) “Advances in bioartificial liver devices”, *Hepatology* 34(3): 447-454
 20. Strain, A. J. and Neuberger, J. M. (2002) “A bioartificial liver—state of the art”, *Science* 295(5557):1005-1009.