

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/11/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE *Quorum Sensing* ENTRE *Lactobacillus spp.*
CONTRA *Salmonella* Heidelberg EM FRANGOS DE CORTE.

ANA CAROLINA IZIDORO DE MORAES

BOTUCATU
MAIO 2019

ANA CAROLINA IZIDORO DE MORAES

AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE *Quorum Sensing* ENTRE *Lactobacillus spp.*
CONTRA *Salmonella* Heidelberg EM FRANGOS DE CORTE.

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

Orientador Prof. Dr. Adriano Sakai Okamoto

BOTUCATU
MAIO 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Moraes, Ana Carolina Izidoro de.
Avaliação do mecanismo de *Quorum Sensing* entre
Lactobacillus spp. contra *Salmonella* Heidelberg em frangos
de corte / Ana Carolina Izidoro de Moraes. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia

Orientador: Adriano Sakai Okamoto
Capes: 50501062

1. Aves domésticas. 2. Frango de corte. 3. Probióticos. 4.
Salmonella. 5. *Lactobacillus*. 6. Percepção de *Quorum*.

Palavras-chave: aves; comunicação bacteriana; filtrado;
probiótico; spot on the lawn.

Nome do Autor: Ana Carolina Izidoro de Moraes

Título: AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE *Quorum Sensing* ENTRE *Lactobacillus spp.* CONTRA *Salmonella* Heidelberg EM FRANGOS DE CORTE.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof Dr Adriano Sakai Okamoto

Presidente da banca e Orientador

Departamento de Clínica veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof Dr Raphael Lucio Andreatti Filho

Membro da banca

Departamento de Clínica veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a Dr^a Vera Lúcia Mores Rall

Membro da banca

Departamento de Microbiologia e Imunologia

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Data da Defesa: 30 de Maio de 2019.

Agradecimentos

A parte mais difícil de escrever, pois a vida não se encaixa em metodologias e a importância das pessoas em nossa vida não é uma análise estatística.

À Deus por me dar saúde, sabedoria e resiliência.

Ao meu orientador Professor Doutor Adriano Sakai Okamoto por confiar em mim e em meu trabalho durante esses anos.

Aos meus pais Marcos Moraes e Silvana Moraes e minha irmã Ana Carla Moraes que sempre me motivaram na vida, por estarem presentes em todos os momentos, me ajudando a ser um ser humano melhor.

Aos colegas de laboratório, companheiros de vida acadêmica Leticia Gross, Amanda Laurindo, Isabella Ribeiro, Igor Vellano, Camila Oro e a todos que estiveram presente durante esses anos, me auxiliando na condução do projeto e no meu desenvolvimento profissional.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/UNESP pela oportunidade e suporte na realização do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do auxílio a pesquisa numero do processo 2017/17712-4.

A Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão da bolsa de mestrado.

Finalmente, faço questão de agradecer todos os que torceram por mim, amigos, colegas e familiares, pois ninguém vence sozinho.

LISTA DE QUADROS, TABELAS FIGURAS

TABELA 1 <i>Lactobacillus</i> spp. Referência (ATCC).....	34
TABELA 2 Sequência, condições e referências dos primers utilizados na identificação dos <i>Lactobacillus</i> spp.....	35
FIGURA 1 Teste <i>Spot on the Lawn</i>	41
TABELA 3 Resultados expressos em média e desvio padrão de halos de inibição do <i>Lactobacillus</i> spp (isolados). contra <i>Salmonella</i> Heidelberg.....	41
TABELA 4 Média dos halos de inibição de todos <i>Lactobacillus</i> spp. isolados cultivados com todos os filtrados contra <i>Salmonella</i> Heidelberg.....	42
TABELA 5 Resultados da contagem de <i>Salmonella</i> Heidelberg nos cecos das aves, nos diferentes grupos experimentais e colheitas.....	45
TABELA 6 Média, desvio padrão, mínimo e máximo da contagem de <i>Salmonella</i> Heidelberg das colheita.....	46
ANEXO 1 Análise de variância entre os grupos e as coletas (valores de P)....	55
Normas para publicação.....	56
Artigo Publicado Bacterial communication between <i>Lactobacillus</i> spp. isolated from poultry in the inhibition of <i>Salmonella</i> Heidelberg—proof of concept.....	57

Sumário

CAPÍTULO 1	8
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Salmonelose	13
2.3. Microbiota intestinal das aves	16
2.4. Probióticos.....	17
2.5. Comunicação bacteriana.....	18
3. OBJETIVO	19
3.1. Objetivo específico <i>in vitro</i>.....	20
3.2. Objetivo específico <i>in vivo</i>.....	20
CAPÍTULO 2	31
DESCRIÇÃO DO PROBLEMA.....	32
MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
Amostras	34
Identificação dos <i>Lactobacillus</i> spp.	35
Experimento <i>in vitro</i>	36
Cultivo das amostras com filtrado	37
Experimento <i>in vivo</i>	37
Aves	37
Local	37
Comissão de ética.....	37
Delineamento experimental.....	38
Desafio com <i>Salmonella</i> Heidelberg	38
Contagem da <i>Salmonella</i> Heidelberg	39
RESULTADOS	40
CONCLUSÃO	48

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE *Quorum Sensing* ENTRE *Lactobacillus spp.* CONTRA *Salmonella* Heidelberg EM FRANGOS DE CORTE.

MORAES, A. C. I. AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE *Quorum Sensing* ENTRE *Lactobacillus spp.* CONTRA *Salmonella* Heidelberg EM FRANGOS DE CORTE. Botucatu, 2019. 62p. Defesa Mestrado Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

RESUMO

Uma das principais doenças transmitida por alimento é a salmonelose, causada pela bactéria *Salmonella spp.*, ela está presente em vários aviários, e com o aumento da produção avícola, se disseminou nos aviários, tornando-se um problema pertinente e de grande importância na saúde pública e animal. Com isso medidas de controle foram instituídas, entre elas o uso de antimicrobiano, causando diversas discussões, principalmente em relação a resistência bacteriana á antimicrobianos utilizados na medicina humana, onde medidas alternativas estão sendo desenvolvidas para evitar o uso dos antimicrobianos. Dessa forma o objetivo do projeto foi avaliar a capacidade dos *Lactobacillus spp.*, isolados na inibição da *Salmonella* Heidelberg (SH), pelo mecanismo de *quorum sensing in vitro* e *in vivo*. Foram colhidos de suabes cloacal de frangos de corte que passaram por provas fenotípica e molecular. Esses isolados foram submetidos ao teste de inibição em placa para avaliar a capacidade de inibição da SH. Em seguida foram produzidos os filtrados, a partir dos *Lactobacillus sp.* (ATCC), separadamente, com contato com a SH. Esses isolados foram cultivados com os filtrados, separadamente e em seguida submetidos novamente ao teste de inibição em placa. Dessa maneira, foi possível medir e comparar os halos de inibição, para a verificação da ocorrência da comunicação bacteriana entre os *Lactobacillus sp.* (ATCC) e os isolados. Foi realizada a análise estatística selecionando um *Lactobacillus spp.* isolado de frango de corte e um filtrado os quais obtiveram melhores resultados no teste *in vitro*. O teste *in vivo* foi dividido em quatro tratamentos, *Lactobacillus spp.*, filtrado, *Lactobacillus spp.* mais o filtrado e o sem tratamento, todos foram desafiados com SH. Após o teste *in vivo* pode se concluir que o filtrado e o *Lactobacillus spp.* interferiram diretamente na redução de SH nas aves.

Palavra chave: Aves, comunicação bacteriana, filtrado, probiótico, *Spot on the Lawn*.

MORAES, A. C. I. EVALUATION OF THE *Quorum Sensing* MECHANISM BETWEEN *Lactobacillus* spp. AGAINST *Salmonella* Heidelberg IN cut chicken. Botucatu, 2019, 62p. Dissertation, (Master). School of Veterinary Medicine and Animal Science, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT:

One of the main food-borne diseases is salmonellosis, caused by the bacterium *Salmonella* spp., It is present in several aviaries, and with the increase of poultry production, it has spread in aviaries, becoming a relevant problem and of great importance in health public and animal. With this, control measures were instituted, including the use of antimicrobial, causing several discussions, mainly regarding bacterial resistance to antimicrobials used in human medicine, where alternative measures are being developed to avoid the use of antimicrobials. Thus, the objective of the project was to evaluate the ability of *Lactobacillus* spp., isolated in the inhibition of *Salmonella* Heidelberg (SH), by in vitro and in vivo quorum sensing mechanism. They were harvested from cloacal swabs of chickens that underwent phenotypic and molecular tests. These isolates were subjected to plaque inhibition test to assess the inhibitory capacity of SH. Filtrates were then produced from *Lactobacillus* sp. (ATCC), separately, with SH. These isolates were cultured with the filtrates separately and then re-plate inhibited. In this way, it was possible to measure and compare inhibition halos to verify the occurrence of bacterial communication between *Lactobacillus* sp. (ATCC) and the isolates. Statistical analysis was performed by selecting a *Lactobacillus* spp. isolated from chickens and a filtrate which obtained better results in the in vitro test. The in vivo test was divided into four treatments, *Lactobacillus* spp., filtered, *Lactobacillus* spp. plus the filtrate and the untreated, all were challenged with HS. After in vivo testing it can be concluded that the filtrate and *Lactobacillus* spp. interfered directly in SH reduction in chickens.

Keyword (s): chickens, bacterial communication, inductor, pro-biotic, Spot on the Lawn.

1. INTRODUÇÃO

A avicultura industrial tem como objetivo produzir alimento de qualidade a baixo custo, sendo um produto promissor para o consumidor final (SILVA, ANDREATTI FILHO, 2000).

O Brasil ocupa a segunda posição na produção mundial de carne de frango, atrás dos Estados Unidos (FRANCO, 2017), mas é o maior exportador desde de 2004 (UBABEF, 2011). E por isso se faz necessário que as criações avícolas tenham um programa rigoroso de biosseguridade para diminuir o desafio às doenças.

As enterobactérias mais frequentes em doenças transmitida por alimentos são do gênero *Salmonella* spp. (MARCHI *et al*, 2011) e entre os sorovares com maior importância é a *Salmonella* Heidelberg, pois tem um alto poder zoonótico (HOFER, SILVA FILHO, REIS, 1997), além disso é o sorovar com maior invasão comparando com os outros sorovares, causando a doença de forma mais grave (COLLA *et al*. 2012).

Com o intuito de controlar as *Salmonellas* spp. nos aviários, iniciou o uso de antimicrobianos que por muitas vezes era feito de forma indiscriminada, o que promoveu o aumento das amostras multirresistentes aos antimicrobianos, se tornando uma preocupação com a saúde pública e dos animais (BASSANI, 2017), por isso medidas alternativas estão sendo desenvolvidas, que são os probióticos, bactérias que fazem parte da microbiota natural das aves, auxiliando no equilíbrio da microbiota intestinal, pela competição do sítio de ligação nos enterócitos e competição por nutrientes com bactérias patogênicas, melhoram absorção de nutrientes, modulam a resposta imunológica das aves e produzem substâncias bactericidas (SILVA, ANDREATTI FILHO, 2000; KURITZA, WESTPHAL, SANTIN, 2014; MEDINA-SAAVEDRA *et al*, 2017).

Na composição dos probióticos existem diversas bactérias e leveduras sendo o *Lactobacillus* spp., a principal bactéria encontrada nos produtos comerciais.

Uma outra forma que o *Lactobacillus* spp. utiliza para a inibição da *Salmonella* spp. é através da produção de bacteriocinas e comunicação intra e interespecie que ocorre pelo mecanismo do *Quorum Sensing*, onde as bactérias notam as mudanças no ambiente por meio de substâncias sinalizadoras secretadas por células individuais, são reconhecidas por receptores específicos de outras bactérias. O que leva a modificação do comportamento bacteriano, resultando em resposta coletiva a qual regulam atividades fisiológicas que podem ser vantajosas, como mudança para um ambiente com maior oferta de nutrientes, formação de biofilme que conferem proteção contra ação do ambiente, controle da densidade populacional, expressão gênica, fatores de virulência, produção de bacteriocinas, para sobreviver e prosperar no ambiente (HAWWER *et al*, 2016).

CONCLUSÃO

Houve a comunicação bacteriana entre os *Lactobacillus* spp. de referência e os isolados de campo, tanto no experimento *in vitro* quanto no experimento *in vivo*, portanto o *quorum sensing* ocorre entre cepas de *Lactobacillus* spp. diferentes na microbiota intestinal de frangos de corte.

REFERÊNCIA

ADAK, S.;UPADRASTA, L.;KUMAR, S. P. J.;SONI, R.;BANERJEE, R. 2011. Quorum quenching – an alternative antimicrobial therapeutics. *Science Against Microbial Pathogens*. A. Mendez-Vilas ed. Formatex Research Center, Badajoz, Spain. p.586–593.

ANDREATTI FILHO, R.L. Paratifo aviário. *Saúde aviária e doenças*. São Paulo: Roc, p. 96- 111, 2007.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consultas: Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-uca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2864062&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=probioticos&inheritRedirect=true

BASSLER, B.L.;LOSICK, R. 2006. Bacterially Speaking. *Cell*. 125:237–246.

BERCHIERI JUNIOR, A. Salmonellose Aviária. In: Berchieri Júnior, A.; Macari, m. *Doença das aves*, Campinas: Facta, 2000. Cap 4, p. 185-195.

BERNDT, A.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, U. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. *Infection and Immunity*, v. 75, n. 12, p. 5993-6007, 2007.

BOYLE, E.C; BISHOP, J.L; GRASSL, G.A.; FINLAY, B.B. *Salmonella: from pathogenesis to therapeutics*. *J. Bacteriol. Mar*; v. 189, ed. 5, p.1489–1495. 2007.

COEURET V, GUEGUEN M, VERNOUX JP. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotics products. *Int J Food Microbiol*. V. 97(2), p.147-156, 2004.

COLLA, F.L.; RODRIGUES, L.B.; BORSOI, A.; DICKEL, E.L.; NASCIMENTO, V.P.; SANTOS, L.R. Isolamento de Salmonella Heidelberg em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte. Arquivos do Instituto Biológico. V. 79(4)p. 603-606, 2012.

DOYLE, M.P.; CLIVER, D.O. Salmonella. In: CLIVER, D.O. (Ed.). Foodborne Diseases. London: Academic Press, 1990. p.185-201.

DUBRNET, S.; DESMASURES, N.; GUÉGUEN, M. 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. Microbiol. Let., 214: 271-275.

FERREIRA, F.A.B.; KUSSAKAWA, K.C.K. Uso de probióticos na alimentação de frangos de corte. Biotecnologia, v. 8, p. 40-43, 1999.

FOLEY, S.L; LYNNE, A.M. Food animal-associated Salmonella challenges, pathogenicity and antimicrobial resistance. Journal of Animal Science, v. 86, p. 173-187, 2008.

FUQUA, W.C.; WINANS, S.C.; GREENBERG, E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density LuxI family of cell density-responsive transcripti responsive transcriptional regulators. onal regulators. J. Bacteriol.1994, v.176 p. 269-275.

GRIFFITHS, M. Quorum sensing. In: M. Griffiths. Understanding pathogen behaviour: virulence, stress response and resistance. Woodhead July 2005 .Cap.22, p.580-640.

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. Antigenic formulae of the Salmonella Serovars. ed 9th, Paris: Institut Pasteur, 2007. WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella.

HAWVER, L.A.; JUN G, S.A.; Ng,Wai-Leung.Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. Federaton of European Microbiological Societies. Microbiology Reviews, v. 40, n.5, p. 738–752, 2016.

HANSON, L.A.; YOLKEN, R.H. Probiotics, Other Nutritional Factors and Intestinal Microflora. Nestlé Nutrition Workshop Series, v. 42, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999.

HOLZAPFEL, W.H. et al. Overview of gut fl ora and probiotics. International Journal of Food Microbiology, v.41, p.85-101, 1998.

HOOSHANGI, S.;BENTLEY, W.E. From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuitry and applications. Curr. Opin. Biotechnol. V.19, p.550–555, 2008.

HUYGHEBAERT, G. et al. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. Veterinary Journal, v.187, p.182-188, 2011.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; DE PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P. I.; WEILL F. X. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Research in Microbiology, Paris, v. 165, n. 7, p. 526-530, 2014

JOHNSON B.R.; KLAENHAMMER, T.R. Impact of genomics on the field of probiotic research: historical perspectives to modern paradigms. Antonie Van Leeuwenhoek v.106 p.141–156. 2014

KHMELI, I. A.; METLISKAYA A. Z. Quorum sensing regulation of gene expression: a promising target for drugs against bacterial pathogenicity. Mol. Biol. v.40 p.169–182, 2006.

LEE, K. et al. Direct-fed antimicrobials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. *Journal of Poultry Science*, v.47, p.106-114, 2010.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr., W.C. *Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas colorido*. Ed Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. 2001. p. 679 -680.

MAIORKA, A. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. In: V Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Anais. Chapecó, 2004, p. 26-41.

MAIORKA, A.; DAHLKE, F.; MORGULIS, M.S.F.A. Broiler adaptation to post-hatching period. *Ciência Rural*. Santa Maria, 2006. v. 36, n. 2.

MILLER, M.B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001. v.55: p.165-199.

NADER DE MACIAS, M.E.; ROMER, M.E.; APELLA, M.C.; GONZALES, S.N.; OLIVER, G. Prevention of infectious diarrhea produced by *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by feeding fermentation milk with lactobacilli. *J. Food Prot*, 1993. v. 56, p. 401-405.

READING, N.C.; SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 2006; v. 254 ,p.1–11.

RIBEIRO ,A.R.; KELLERMANN ,A.; SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P. Resistência antimicrobiana de *Salmonella enteritidis* isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* , Belo Horizonte 2008. Vol. 60, n.5, p. 1259-1262.

RODRIGUES, D.P. Perspectivas atuais e falhas no diagnóstico antigênico de *Salmonella* spp.: importância no reconhecimento dos sorovares circulantes,

emergentes e exóticos. In: Simpósio Internacional sobre Salmonelose Aviária., 2011, São Paulo. Anais. São Paulo: UBABEF, 2011.

SCHWARTZ, K.J. Salmonellosis in: STRAW, B.E.; D'ALLAIRES, S.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. Disease Swine. 8th ed. Ames: Iowa University Press, 2000

SILVA, E. N.; DUARTE, A. Salmonella Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. Rev. Bras. Cienc. Avic. 2002. vol.4 no.2.

SILVA, E. N.; ANDREATTI FILHO, R. L. Probióticos e prebióticos na avicultura. IN: II Simpósio de Sanidade Avícola. Santa Maria, 2000.

SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRAS, R.A.F.; LIMA FILHO, J.L. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. Ciênc. saúde coletiva. 2008. vol.13 n.5.

SOLA, M.C.; OLIVEIRA, A.P.; FEISTEL, J.C.; REZENDE, C.S.M. Mecanismo de Quorum Sensing e sua relevância na microbiologia de alimentos. Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, 2012 v.8, N.14; p.14 a 19.

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; BASTOS, R.R. et al. Avaliação de associações e similaridades em epidemiologia veterinária por meio da análise de correspondência. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2002. v.54, p.539-542.

TANNOCK, G. W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. International Dairy Journal, Barking. 1998 v. 8, n. 5-6, p. 527-533.

TORTUERO, F. Influence of the implantation of Lactobacillus acidophilus in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. Poultry Science. Madrid, 1973. v.52, p.197-203.

VAN ASTEN, A.J.A.M.; KONINKX, J.F.J.G.; VAN DIJK, J.E. Salmonella entry: M cells versus absorptive enterocytes. *Veterinary Microbiology* [online] 2005, v.108, p.149-152.

VELGE, P., CLOECKAERT, A., BARROW, P. Emergence of Salmonella epidemics: The problems related to Salmonella enterica serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet. Res.* 2005. v. 36, p. 267-288.

WATERS C.M.; BASSLER B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005, v.21, p. 319-346.