

LEVEDURAS KILLER: BIOLOGIA, ECOLOGIA E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICASBRUNO MOTTA OLIVEIRA¹, FABIO FERNANDES BARBOSA², CARLA SANTOS RIBEIRO PINHEIRO¹, ANA PAULA TROVATTI UETANABARO^{1,2,3} & HÉLIO MITOSHI KAMIDA^{1,3,4*}¹Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM), Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), BR 116, Km 03, 44031-460, Feira de Santana, Bahia, Brasil²Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (UEFS/FIOCRUZ), Depto. de Ciênc. Biológicas/ UEFS³Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico, Departamento de Saúde/ UEFS⁴Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional FAPESB/CNPq

*Author for correspondence: (hmkamida@terra.com.br)

(Leveduras killer: biologia, ecologia e aplicações biotecnológicas) – A atividade *killer* de leveduras tem sido observada em mais de 90 espécies e diversas toxinas *killer* (micocinas) produzidas por linhagens pertencentes a diversos gêneros têm sido extensivamente estudadas. Muitos estudos têm destacado as aplicações biotecnológicas do fenômeno *killer*: (i) controle de leveduras contaminantes de processos fermentativos; (ii) taxonomia e biotipagem de leveduras de interesse clínico e industrial; e (iii) aplicações biomédicas como novos agentes antimicóticos. Este trabalho de revisão aborda as potenciais aplicações do sistema *killer* de leveduras com base em estudos até o momento realizados, demonstrando o potencial biotecnológico dessas leveduras.

Palavras-chave: Leveduras *killer*, toxinas, biotecnologia.

(Killer yeasts: biology, ecology and biotechnological applications) – The killer activity of yeasts has been observed in more than 90 species and many killer toxins (mycocins) produced by strains belonging to different genera have been extensively studied. Many studies have highlighted the biotechnological applications of the killer phenomenon: (i) control of yeasts contaminants of process fermentations; (ii) taxonomy of yeasts of clinical and industry interest; and (iii) applications in medicine like new antimycotic agents. This review deals with the potential biotechnological applications of the killer system of yeasts emphasizing the studies that have been developed until now.

Key words: Killer yeasts, toxins, biotechnology.

INTRODUÇÃO

As leveduras são microrganismos eucarióticos unicelulares, que se reproduzem geralmente de forma assexuada por brotamento e em poucos casos por fissão binária, classificados no Domínio *Eukarya* (WOESE *et al.*, 1990), Reino Fungi, porém, não formam um grupo taxonômico ou filogenético específico (KURTZMAN & PISKUR, 2006). Estes microrganismos possuem uma diversidade filogenética que as insere tanto na divisão Ascomycota como na Basidiomycota e estimativas atuais indicam que somente 1% de todas as espécies de leveduras esteja descrito (KURTZMAN & PISKUR, 2006), embora cerca de 1.500 espécies já tenham sido descritas (KURTZMAN & FELL, 2006).

Por possuírem propriedades fisiológicas muito úteis, as leveduras são muito empregadas no campo biotecnológico. A fermentação do açúcar é a aplicação mais antiga e muitos tipos de leveduras são utilizados para produzir diversos alimentos, como, por exemplo: fabricação de pão, fermentação de cerveja e de vinho e produção de xilitol (SREENIVAS *et al.*, 2004). São empregadas também em processos de biorremediação por degradarem hidrocarbonetos como alcanos, ácidos graxos, óleos e gorduras. Alguns suplementos probióticos também utilizam leveduras para manter e restaurar a microbiota do trato gastrointestinal, reduzir os sintomas de diarreia aguda em crianças, prevenir a re-infecção por *Clostridium difficile* e

reduzir a incidência de diarreia associada a antibióticos e HIV/AIDS. A ocorrência do fenômeno *killer* é uma das características apresentadas pelas leveduras que contribuíram para que elas se tornassem microrganismos modelos em diversos estudos de pesquisa básica (MARQUINA *et al.*, 2002; MAGLIANI *et al.*, 1997).

Este fenômeno foi descrito em 1963 por Bevan e Makower a partir da observação de que alguns isolados da levedura *Saccharomyces cerevisiae* secretavam uma substância que era letal para outras linhagens de mesma espécie. A partir de então, uma série de estudos tem demonstrado que este fenômeno é relativamente comum em diversos gêneros de leveduras (SOMERS & BEVAN, 1969; POLONELLI *et al.*, 1991; MAGLIANI *et al.*, 1997; BUZZINI & MARTINI, 2001; BUZZINI *et al.*, 2004).

O fator *killer* representa importantes implicações ecológicas e industriais, assim, a sua constatação abriu perspectivas de aplicações biotecnológicas. MAGLIANI *et al.* (1997) publicaram uma revisão do tema abordando a biologia, ecologia, epidemiologia e potencial terapêutico do sistema *killer* e MARQUINA *et al.* (2002) destacaram a diversidade biológica das leveduras e toxinas *killer* e as potenciais aplicações biotecnológicas, chamando atenção para o fato de que as aplicações industriais das mesmas é um campo de estudo em expansão.

Este trabalho tem como objetivo revisar brevemente a biologia e a ecologia das leveduras *killer*, bem como as aplicações biotecnológicas de suas toxinas e microrganismos produtores.

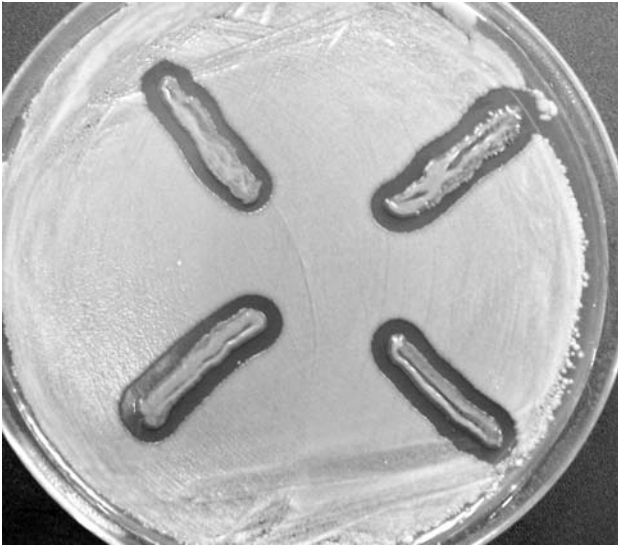


Fig. 1. Halos de inibição do crescimento (setas) da levedura *Candida glabrata* Y55 sensível a toxina killer produzida por *Saccharomyces cerevisiae* K1 (repique em forma de traços).

BIOLOGIA E ECOLOGIA DO SISTEMA *KILLER*

A atividade *killer* é fundamentada na produção, por leveduras, de exotoxinas (geralmente proteínas ou glicoproteínas) com atividade antimicrobiana mediada por receptores de parede celular específico nos microrganismos sensíveis, de forma que as toxinas *killer* são originalmente definidas como exotoxinas capazes de matar células sensíveis pertencentes à mesma espécie ou espécies de mesmo gênero. As leveduras *killer*, por sua vez, são imunes à atividade de sua própria toxina (MAGLIANI *et al.*, 1997). Logo após a descoberta do fenômeno, muitos pesquisadores centraram esforços em estudos sobre o efeito *killer*, o qual pode representar um modelo de competição biológica semelhante ao das bacteriocinas entre as bactérias (HARDY, 1975).

A produção de tais toxinas também confere às linhagens produtoras uma vantagem na competição, em relação às células sensíveis, por nutrientes disponíveis no ambiente. No entanto, estudos posteriores demonstram cada vez mais um maior espectro de ação das toxinas *killer*, pois, além de leveduras filogeneticamente relacionadas, elas também atuam contra certas bactérias Gram-positivas e diversos fungos filamentosos de interesse clínico e ambiental (POLONELLI & MORACE, 1983; POLONELLI *et al.*, 1986; WALKER *et al.*, 1995). Baseado em reações cruzadas de letalidade e imunidade entre as leveduras *killer*, seus fenótipos são classificados em 11 grupos distintos (K1-K11) (YOUNG & YORGIU, 1978), sendo que embora exista uma considerável quantidade de informação publicada relatando as aplicações dessas toxinas, somente aquelas pertencentes aos grupos K1, K2 e K6 são bem caracterizadas (HODGSON *et al.*, 1995). As toxinas *killer* podem exercer diversos mecanismos de ação sobre as linhagens sensíveis: inibição da replicação de DNA (COMITINI *et al.*, 2004); indução de alterações na permeabilidade da membrana; confinamento do processo de divisão celular na fase G1; interferência na

síntese da parede celular por meio de inibição da enzima sintase de glicano ou por hidrólise de glicano - maior componente estrutural da parede celular. Estudos sobre a natureza do fator *killer* realizados em *Saccharomyces cerevisiae* demonstram que estas proteínas possuem um espectro de ação específico, sendo dependentes de pH e condições de aeração e temperatura, de forma que, em geral, a atividade das toxinas é altamente estável somente numa faixa de pH entre 4,2 e 4,7 e esta mesma estabilidade diminui com a elevação da temperatura e é perdida em valores de pH acima de 5,5 (WOODS & BEVAN, 1968). A massa molecular das proteínas é relativamente baixa, variando de 18 a 300 kDa, a depender da espécie de levedura (SOARES & SATO, 2000).

As vantagens que as leveduras com características *killer* possuem sobre linhagens sensíveis no ambiente podem explicar sua abundância, uma vez que esse mecanismo pode ser utilizado na competição com outras leveduras e/ou microrganismos. Levando-se em consideração o habitat, as frutas provavelmente são os mais importantes, uma vez que ¼ das linhagens isoladas das frutas apresentam a característica *killer* (MAGLIANI *et al.*, 1997). Essa diversidade pode ser explicada pelo fato das frutas oferecerem condições ideais para o desenvolvimento das mesmas, tais como baixo pH e alta concentração de açúcar. Outro aspecto relevante é que as frutas estão expostas no ambiente, fato que contribui para que elas sejam visitadas por potenciais vetores, como abelhas, besouros, pássaros ou outros animais. Esse fato é corroborado pelos resultados obtidos por GANTER *et al.* (1986) e LACHANCE *et al.* (1995).

Nesse contexto, os aspectos ecológicos, principalmente a competição, têm sido uma das variáveis mais importantes na determinação do fenótipo *killer* em leveduras (LATHAM, 1998).

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS LEVEDURAS E TOXINAS *KILLER*

As leveduras *killer* e suas toxinas apresentam inúmeras aplicações em potencial, sejam elas de caráter biotecnológico ou não. Dentre os campos biotecnológicos de aplicação, destacam-se a fermentação de bebidas, taxonomia e medicina. Além desses, MARQUINA *et al.* (2002) destacaram a aplicações em estudos dos mecanismos de processamento e secreção de proteínas, além da interação das toxinas com as células sensíveis (SCHMITT, 1995), controle biológico na agricultura (WALKER *et al.*, 1995) e tecnologia de alimentos (LOWES *et al.*, 2000).

Vale salientar que elas vêm sendo utilizadas como sistemas de modelo em pesquisa básica para estudar os mecanismos de regulação de processamento, secreção e ligação de polipeptídeos eucarióticos a receptores. Através da tecnologia de DNA recombinante, plasmídeos *killer* de *S. cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis* podem ser úteis como vetores de clonagem para secreção efetiva de polipeptídeos exógenos expressados (SUGISAKI *et al.*, 1985; DIGNARD *et al.*, 1991).

Na indústria de alimentos e processos fermentativos, a característica *killer* em linhagens de leveduras pode combater os contaminantes selvagens durante a produção de cerveja (YOUNG, 1981), vinho (HARA *et al.*, 1980; BOONE *et al.*, 1990) e pão (BORTOL *et al.*, 1986). Leveduras *killer* têm sido também consideradas úteis no controle biológico de leveduras indesejáveis na preservação de alimentos (PALPACELLI *et al.*, 1991).

Na área biomédica estão sendo utilizadas particularmente na biotipagem das leveduras patogênicas como *Candida albicans* (YOUNG, 1987) e *Cryptococcus* spp. (YOUNG & YORGIU, 1978). Há também diversos estudos que destacam o notável potencial das toxinas *killer* como novos agentes antimicóticos no tratamento de infecções fúngicas em humanos e animais (POLO NELLI *et al.*, 1986; YAMAMOTO *et al.*, 1988; HODGSON *et al.*, 1995; MATTEWS *et al.*, 1998; BUZZINI & MARTINI, 2001).

O SISTEMA KILLER DE LEVEDURAS E A FERMENTAÇÃO

De maneira similar à ocorrência da relativa abundância das linhagens de leveduras *killer* no ambiente, em processos industriais de fermentação, as leveduras utilizadas e responsáveis por quase toda fermentação também possuem uma alta incidência de características *killer*. Isto pode ser até mesmo reflexo de sua vantagem competitiva sobre leveduras comerciais que, em sua maioria, são sensíveis às linhagens de leveduras *killer* (SCLAFANI & FANGMAN, 1984; SEKI *et al.*, 1985; JAVADEKAR *et al.*, 1995).

Em alguns processos de fermentação, as leveduras *killer* são eficientemente competitivas com as conhecidas fermentadoras comerciais, fato este que é de grande importância e geralmente ocorre em culturas contínuas. Em culturas do tipo batelada somente há competição na presença de elevado número da linhagem *killer* contaminante, pois em baixos níveis o grande inóculo das leveduras fermentadoras compete eficientemente pelo consumo de nutrientes limitando o crescimento de linhagens *killer* (MARQUINA *et al.*, 2002).

O pH ótimo para produção e estabilidade da toxina *killer* do tipo K1, comumente isolada e caracterizada em *S. cerevisiae*, varia entre 4,6 e 4,8, o que para aplicação na fabricação de vinho não oferece tanto risco. No entanto, a toxina K2, cujo pH ótimo varia entre 2,9 e 4,9, pode representar uma ameaça para a indústria de vinho, visto que as leveduras *killer* produtoras dessa toxina desencadeiam uma fermentação curta e pouco eficiente (VAN VUURE & WINGFIELD, 1986).

Assim sendo, linhagens neutras como também *killer* podem ser preferíveis para a fermentação do vinho desde que possuam propriedades desejáveis para sua fabricação. As leveduras *killer* podem ser utilizadas como iniciadoras da cultura como forma de controlar o crescimento de leveduras contaminantes durante as etapas iniciais da fermentação do vinho (SANTOS & MARQUINA, 2004; NALLY *et al.*, 2005). Outro exemplo é que para prevenir o excessivo crescimento de linhagens

fermentativas indesejáveis, leveduras *killer*, devidamente adequadas para a produção de cerveja, têm sido construídas por citoducção (SCHMITT, 1995). Este método permite que a transferência da característica *killer* de uma linhagem para outra seja possível sem qualquer modificação no genótipo nuclear. Isto é muito importante visto que muitas características bioquimicamente significativas para as linhagens de leveduras utilizadas em indústrias de fermentação de bebidas são conferidas pelo genótipo nuclear. A fusão de protoplastos é uma técnica que também tem sido utilizada em leveduras *killer* com o objetivo de se obter linhagens detentoras de boas propriedades organolépticas (JAVADEKAR *et al.*, 1995).

A ampla ocorrência do fenótipo *killer* em leveduras de interesse para produção de vinho é fato já observado em muitos países e isto tem contribuído para o aumento do seu uso nos processos de fermentação do vinho. A compatibilidade e o tipo da linhagem de levedura associada que pode ser utilizada em fermentações alcoólicas pelo processo de co-cultivo deve ser cuidadosamente avaliada para evitar interferência entre células sensíveis e *killer* (LAPLACE *et al.*, 1992). Um longo debate tem acontecido sobre os níveis iniciais de células *killer* e sensíveis que são necessários ao inóculo para estabelecer a predominância de uma delas. Estudos experimentais mostram que as leveduras *killer* predominam quando elas possuem pelo menos um número igual ao de células sensíveis durante a inoculação. A informação de que a produção de toxinas *killer* é limitada pela alta concentração de açúcares tem sido contestada até mesmo em fermentações controladas, pois o efeito *killer* também foi verificado nestas condições (Tredoux *et al.*, 1986; VAN VUUREN & WINGFIELD, 1986).

A utilização de leveduras *killer* como iniciadoras do processo de fermentação do vinho demonstra um papel crucial na preservação do produto final, pois o protege da refermentação e da produção de película. As leveduras *killer* também inibem a microbiota nativa responsável por muitos fenômenos indesejáveis (HARA *et al.*, 1980). Estes fatores benéficos e relevantes gerados pelo fenômeno *killer* em células iniciadoras de processos fermentativos têm levado à seleção de isolados cada vez mais apropriados, de modo a garantir a prevenção total do crescimento de linhagens de leveduras contaminantes que normalmente pertencem aos gêneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Picchia* e *Saccharomyces* (NALLY *et al.*, 2005; PÉREZ-NEVADO *et al.*, 2006).

O SISTEMA KILLER DE LEVEDURAS E A TAXONOMIA

As leveduras formam um grupo altamente heterogêneo de organismos unicelulares e embora muitos critérios discriminantes permitam o reconhecimento dos grupos ascomicetos e basidiomicetos, a distinção de leveduras diferentes é freqüentemente difícil. Estudos moleculares mostraram que muitas das características clássicas normalmente utilizadas para definir um táxon, tais como fermentação, assimilação de açúcares, presença de esporos e morfologia, possuem um valor muito limitado.

Dessa forma, pesquisas que objetivem estabelecer testes simples que possam ser utilizados amplamente passam a ter uma grande importância para a taxonomia. Um destes testes pode consistir na determinação das diferenças de sensibilidade a toxinas produzidas por linhagens *killer* que são ativas contra leveduras taxonomicamente relacionadas a produtoras de toxinas *killer* (PROVOST *et al.*, 1995; GOLUBEV, 1998). Assim, de acordo com os diferentes níveis de sensibilidade às toxinas *killer*, é possível agrupar leveduras em categorias que são reprodutíveis até mesmo quando outras características são heterogêneas (MORACE *et al.*, 1984; GOLUBEV & SHABALIN, 1994; PROVOST *et al.*, 1995; GOLUBEV, 1998).

A primeira aplicação do sistema *killer* de leveduras para a simples diferenciação intra-específica de fungos patogênicos foi descrita para isolados de *C. albicans* (POLONELLI *et al.*, 1983). O potencial para discriminação de linhagens pode ser substancialmente melhorado pelo uso de um grande número de leveduras *killer* efetivas ou suas toxinas purificadas em procedimentos indiretos (CAPRILLI *et al.*, 1985). A utilidade do sistema *killer* de leveduras como uma ferramenta epidemiológica prova ser também de grande valor na identificação de prévios casos de infecções fúngicas adquiridas em hospital (POLONELLI & MORACE, 1983) e quando aplicado para diferenciação de outras leveduras oportunistas que não sejam *C. albicans*, tais como *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Cryptococcus neoformans* (MORACE *et al.*, 1984). Em procedimentos indiretos para biotipagem, as toxinas *killer* são usadas no lugar das células de leveduras correspondentes para diferenciação de linhagens de isolados de *C. albicans*. Por meio de um programa de computador utilizado para avaliar, gravar e comparar os halos de inibição gerados por cada toxina *killer* sobre cada linhagem sensível, os isolados de *C. albicans* foram também agrupados em biotipos dentro de uma margem pré-definida de erro (POLONELLI *et al.*, 1985). A demonstração de diferentes biotipos dentro de fungos micelianos prova também que o sistema *killer* representa um método simples e eficaz para estudos epidemiológicos de microrganismos que são muito difíceis de realizar por outros procedimentos (POLONELLI *et al.*, 1987).

O sistema *killer* de leveduras, quando corretamente utilizado, tem provado ser de grande valor na identificação de espécies e variedades de microrganismos heterogêneos como foi observado em um trabalho desenvolvido por MORACE *et al.* (1988) em que, a partir de estudos prévios que permitiram a diferenciação de linhagens pertencentes a espécies de actinobactérias aeróbias, o sistema *killer* de leveduras foi usado para separar espécies que tinham sido identificadas como pertencentes ao complexo *Nocardia asteroides*. Abordagens diferentes e complementares, tais como hipersensibilidade induzida por antígeno, hibridização DNA-DNA e testes de susceptibilidade a antibióticos, fortaleceram a separação das linhagens *N. asteroides* em *N. asteroides sensu stricto* e *N. farcinica* (TSUKAMURA, 1969; SCHAAL & REUTERSBERG, 1978). A susceptibilidade das variedades *C. neoformans* var. *gattii*

e *C. neoformans* var. *neoformans* às toxinas *killer* foi revelada pelo uso de uma linhagem *killer* pertencente à espécie *C. laurentii* (GOLUBEV & KUZNETSOVA, 1989). Dessa forma, o simples e econômico teste *killer* pode permitir a identificação de duas variedades independente da disponibilidade de anti-soros caros e específicos para tal finalidade. A sorotipagem sempre implica na prévia disponibilidade de anti-soros específicos, que podem não ser facilmente encontrados em laboratórios. Por outro lado, o sistema *killer* de leveduras tem mostrado ser um método reprodutível e eficaz para diferenciar isolados de diversas espécies clinicamente importantes, como, por exemplo, *N. asteroides* (MORACE *et al.*, 1988).

O SISTEMA *KILLER* DE LEVEDURAS E A MEDICINA

Uma das principais aplicações das leveduras *killer* na área médica ocorre na biotipagem, principalmente de leveduras patogênicas como *C. albicans* e *C. neoformans* (HAMAL *et al.*, 1998). As diversas toxinas *killer* produzidas e caracterizadas também têm sido sugeridas como novos agentes antimicóticos em potencial para o tratamento de infecções (POLONELLI *et al.*, 1991; CAILLIEZ *et al.*, 1994). No entanto, como elas são freqüentemente muito lábeis às condições fisiológicas de pH e temperatura, sua adição em soluções tamponadas pode resultar no tratamento efetivo de infecções de pele e membrana mucosas por leveduras patogênicas. As toxinas *killer* não podem ser diretamente utilizadas como antibióticos sistêmicos porque induzem uma forte resposta imunológica, o que é uma característica de certa forma já esperada por se tratarem de grandes proteínas exógenas (MAGLIANI *et al.*, 1997). Entretanto, em muitos trabalhos já foi possível obter anticorpos e antibióticos anti-idiotípicos, sintéticos ou naturais, que exercem as mesmas atividades antimicrobianas das toxinas *killer* correspondentes, como também vacinas idiotípicas, capazes de desempenhar um importante papel preventivo e terapêutico (MAGLIANI *et al.*, 2001, 2004, 2005; POLONELLI *et al.*, 2003; FIORI *et al.*, 2006). POLONELLI *et al.* (1991) produziram estes anticorpos, os quais aparentemente compartilhavam o sítio ativo da toxina de *Pichia anomala* e que mimetizaram, *in vitro*, o efeito *killer* da toxina secretada contra *C. albicans*.

As toxinas *killer* de leveduras demonstram uma alta especificidade de ação de modo que as linhagens produtoras são imunes às suas próprias toxinas. Dessa forma, o fator *killer* age efetivamente como um antifúngico específico, implicando na existência de receptores de superfície específicos. A busca por agentes antifúngicos alternativos pode ser baseada na suposição de que sítios específicos para um fator *killer* possuem outras funções essenciais cujos inibidores podem ser antibióticos (BUSSEY & SKIPPER, 1976). Mesmo que possa parecer impróprio considerar que os resultados de interações microbianas estejam relacionados com a atividade de antibióticos convencionais, o antagonismo microbiano pode representar a justificativa para o projeto de novos antibióticos baseado na pressão seletiva da evolução natural. Segundo GOVAN

(1986), se as vantagens competitivas do fenótipo *killer* parecem ser óbvias, a razão biológica pela qual o fenótipo susceptível permanece inalterado durante a evolução parece ser inexplicável. Embora as toxinas microbianas possam ser comparadas a antibióticos peptídicos clássicos, estas moléculas diferem na ligação com receptores de superfície específicos dos microrganismos susceptíveis. Estes receptores devem ser fisiologicamente essenciais, por terem sido preservados apesar das desvantagens resultantes da susceptibilidade aos efeitos letais das toxinas secretadas por microrganismos antagonistas (MAGLIANI *et al.*, 1997). Diante do exposto, seria de grande valor para a medicina a obtenção de antibióticos derivados das toxinas *killer* de leveduras, que tenham como alvos estruturas celulares essenciais de importância fisiológica ou funcional e que *in vivo* não sejam tóxicos às células eucarióticas superiores (MAGLIANI *et al.*, 2004, 2005).

A alta prevalência de susceptibilidade das leveduras patogênicas às toxinas *killer* produzidas por certas leveduras, particularmente pertencentes aos gêneros *Picchia* e *Williopsis*, pode levar a aplicações práticas, como, por exemplo, o desenvolvimento de derivados sintéticos a serem utilizados como agentes antifúngicos. A toxina de 10.721 kDa, produzida por *W. mrakii* age inibindo seletivamente a síntese de β -glicano na parede celular de leveduras susceptíveis através de um mecanismo similar ao de antibióticos antifúngicos como Aculeacina A, Echinocandina B e Papulocandina B (YAMAMOTO *et al.*, 1986). Estes agentes também inibem a atividade *in vitro* da enzima β -1,3-glicano sintetase de leveduras (YAMAGUCHI *et al.*, 1982). Esta inibição geralmente causa um enorme desequilíbrio estrutural e osmótico na célula da levedura, o que fatalmente resulta em morte. Ambas as formas morfológicas dos fungos podem ser susceptíveis à mesma toxina *killer* (POLONELLI *et al.*, 1989). Isto sugere que esta aparente uniformidade de susceptibilidade implica na existência de receptores de parede celular comuns durante os eventos celulares e moleculares que acompanham as variações morfológicas em fungos dimórficos e afetam a susceptibilidade a antibióticos (BETANCOURT *et al.*, 1985).

Apesar de que somente os antibióticos convencionais devam ser usados como agentes terapêuticos efetivos, embora causem indução de resistência em microrganismos susceptíveis, tentativas têm sido feitas a fim de usar as toxinas *killer* de leveduras no tratamento de infecções fúngicas experimentais. Para evitar uma possível inativação por protease e alteração da estabilidade das moléculas em temperatura e pH fisiológico, um modelo de uma micose superficial experimental foi descrito por POLONELLI *et al.* (1986). Neste estudo, a extensão do fenômeno *killer* de leveduras a microrganismos não relacionados taxonomicamente, incluindo *Malassezia furfur* e *M. pachydermatis*, demonstrou a eficácia terapêutica de uma toxina *killer* produzida por uma linhagem de *Picchia anomala* (ATCC96603) em lesões experimentais como pitíriase versicolor e otite externa em animais de laboratório. A pitíriase versicolor é uma micose superficial que parece ser um modelo adequado para a nova abordagem terapêutica de administração tópica de toxinas *killer* de leveduras. Entretanto, o potencial efeito terapêutico do princípio ativo purificado a ser administrado pela via sistêmica visando o tratamento de infecções disseminadas deve ser muito bem avaliado, principalmente no que se refere à instabilidade da molécula em temperatura e pH fisiológico (MAGLIANI *et al.*, 2005).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As leveduras e toxinas *killer* apresentam uma grande potencialidade biotecnológica, podendo ser exploradas em diversos setores de aplicação, principalmente no controle contra leveduras contaminantes de processos fermentativos, na medicina e taxonomia. Pelo fato das leveduras *killer* serem mais predominantes em habitats naturais, uma nova perspectiva é a exploração de novos nichos e, principalmente, ambientes ainda não estudados, pois estes contribuirão para o conhecimento da diversidade e possibilitarão novas aplicações do sistema *killer* de leveduras.

REFERÊNCIAS

- BETANCOURT S, LG TORRES-BAUZA & N RODRÍGUEZ-DEL VALLE. 1985. Molecular and cellular events during the yeast to mycelium transition in *Sporothrix schenckii*. **Sabouraudia** 23: 207-218.
- BEVAN EA & M MAKOWER. 1963. **The physiological basis of the killer character in yeast. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GENETICS, 11. Proceedings... London: Academic Press 1: 203.**
- BOONE C, A-M SDICU, J WAGNER, R DEGRI, C SANCHEZ & H BUSSEY. 1990. Integration of the yeast Kl killer toxin gene into the genome of marked wine yeasts and its effect on vinification. **Am. J. Enol. Vit.** 41: 37-42.
- BORTOL A, C NUDEL, E FRAILLE, R DE TORRES, A GIULETTI, JFT SPENCER & D SPENCER. 1986. Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 24: 414-416.
- BUSSEY H & N SKIPPER. 1976. Killing of *Torulopsis glabrata* by *Saccharomyces cerevisiae* killer factor. **Antimicrob. Agents Chemother.** 9: 352-354.
- BUZZINI P & A MARTINI. 2001. Large-scale screening of selected *Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii* and *Pichia anomala* killer toxin activity against pathogenic yeasts. **Med. Mycol.** 39: 479-482.
- BUZZINI P, L CORAZZI, B TURCHETTI, BURATTA & A MARTINI. 2004. Characterization of the *in vitro* antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. **FEMS Microbiology Letters** 238: 359-365.
- CAILLIEZ JC, N SEGUY, EM ALIOUAT, L POLONELLI, D CAMUS & E DEI-CAS. 1994. The yeast killer phenomenon: a hypothetical way to control *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Méd. Hypoth.** 43: 167-171.
- CAPRILLI F, G PRIGNANO, C LAPELLA & S TAVAROZZI. 1985. Amplification of the killer system for differentiation of *Candida albicans* strains. **Mykosen** 28: 569-573.
- COMITINI F, N PIETRO, L ZACCHI, I MANNAZU & M CIANI. 2004. *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage

- yeasts: purification and characterization. **Microbiology** 150: 2535-2541.
- DIGNARD D, M WHITWAY, D GERMAIN, D TESSIER & DY THOMAS. 1991. Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. **Mol. Gen. Genet.** 227: 127-136.
- FIORI PL, A MATTANA, D DESSI, S CONTI, W MAGLIANI & L POLONELLI. 2006. *In vitro* acanthamoebicidal activity of a killer monoclonal antibody and a synthetic peptide. **J Antimicrob Chemother** 57: 891-898.
- GANTER PF, WT STARMER, M LACHANCE & HJ PHAFF. 1986. Yeast communities from host plants and associated *Drosophila* in southern Arizona: new isolates and analysis of the relative importance of hosts and vectors on community composition. **Oecologia** 70: 386-392.
- GOLUBEV WI. 1998. Mycocins (killer toxins), p. 55-62. In: CP KURTZMAN & JW FELL (eds.). **The yeasts, a taxonomic study**. London: Academic Press.
- GOLUBEV WI & LB KUZNETSOVA. 1989. Formation and spectrum of action of mycocins of the basidiomycete yeast *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner. **Mikrobiologiya** 58: 980-984.
- GOLUBEV W & Y SHABALIN. 1994. Microcin production by the yeast *Cryptococcus humicola*. **FEMS Microbiol. Lett.** 119: 105-110.
- GOVAN JR. 1986. *In vivo* significance of bacteriocins and bacteriocin receptors. **Scand. J. Infect. Dis. Suppl.** 49: 31-37.
- HAMAL P, D KOUKALOVÁ & V HÁJEK. 1998. Personal experience with classification of yeast microorganisms. I. The combined biotyping method of Mencl and Otcenášek and typing using the "killer" phenomenon. **Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.** 47: 87-92.
- HARA S, Y IMURA & K OTSUKA. 1980. Breeding of useful killer wine yeasts. **Am. J. Enol. Vit.** 31: 28-33.
- HARDY KG. 1975. Colicinogeny and related phenomena. **Bacteriol. Rev.** 39: 464-515.
- HODGSON VJ, D BUTTON & GM WALKER. 1995. Anti-*Candida* activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. **Microbiology** 141: 2003-2012.
- JAVADEKAR VS, H SIVA RAMAN & DV GOKHALE. 1995. Industrial yeast strain improvement: construction of a highly occultent yeast with a killer character by protoplast fusion. **J. Indust. Microbiol.** 15: 94-102.
- KURTZMAN CP & JW FELL. 2006. Yeast systematics and phylogeny - implications of molecular identification methods for studies in ecology, p. 11-30. In: CA ROSA & G PETER (eds.). **The yeast handbook**. Germany: Springer-Verlag Berlin Herdelberg.
- KURTZMAN CP & J PISKUR. 2006. Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts, p. 29-46. In: P SUNNERHAGEN & J PISKUR (eds.). **Comparative genomics: using fungi as models**. Germany: Springer-Verlag.
- LACHANCE M-A, DG GILBERT & WT STARMER. 1995. Yeast communities associated with *Drosophila* species and related flies in an eastern oak-pine forest: a comparison with western communities. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 14: 484-494.
- LAPLACE GM, JP DELGENES, R MOLETTA & JM NAVARRO. 1992. Alcoholic glucose and xylose fermentations by the coculture process. Compatibility and typing of associated strains. **Can. J. Microbiol.** 38: 654-658.
- LATHAN BP. 1998. Yeast community persistence in a spatially structured environment. **Microbial Ecology** 36: 60-65.
- LOWES KF, CA SHEARMAN, J PAYNE, D MACKENZIE, DB ARCHER, RJ MERRY & MJ GASSON. 2000. Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocine HMK. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 1066-1076.
- MAGLIANI W, S CONTI, S ARSENI, R FRAZZI, A SALATI & L POLONELLI. 2001. Killer anti-idiotypes in the control of fungal infections. **Curr. Opin. Investig. Drugs** 2: 477-479.
- MAGLIANI W, S CONTI, R FRAZZI, L RAVANETTI, DL MAFFEI & L POLONELLI. 2005. Protective antifungal yeast killer toxin-like antibodies. **Curr. Mol. Med.** 5: 443-452.
- MAGLIANI W, S CONTI, M GERLONI, D BERTOLOTTI & L POLONELLI. 1997. Yeast killer system. **Clin. Microbiol. Rev.** 10: 369-400.
- MAGLIANI W, S CONTI, A SALATI, S VACCARI, L RAVANETTI, DL MAFFEI & L POLONELLI. 2004. Therapeutic potential of yeast killer toxin-like antibodies and mimotopes. **FEMS Yeast Res.** 5: 11-18.
- MARQUINA D, A SANTOS & JM PEINADO. 2002. Biology of killer yeasts. **Int. Microbiol.** 5: 65-71.
- MATTEWS HL, S CONTI, L WITEK-JANUSEK & L POLONELLI. 1998. Effect of *Pichia anomala* killer toxin on *Candida albicans*. **Med. Mycol.** 36: 199-204.
- MORACE G, C ARCHIBUSACCI, M SESTITO & L POLONELLI. 1984. Strain differentiation of pathogenic yeast by the killer system. **Mycopathologia** 84: 81-85.
- MORACE G, G DETTORI, M SANGUINETTI, S MANZARA & L POLONELLI. 1988. Biotyping of aerobic actinomycetes by modified killer system. **Eur. J. Epidemiol** 4: 99-103.
- NALLY MC, YP MATURANO, F VÁZQUEZ & ME TORO. 2005. Behaviour of a wild *Saccharomyces cerevisiae* killer yeast and its isogenic sensitive one with respect to different nitrogen sources in mixed cultures. **Rev. Argent. Microbiol.** 37: 73-77.
- PALPACELLI V, M CIANI & G ROSINI. 1991. Activity of different 'killer' yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. **FEMS Microbiol. Lett.** 84: 75-78.
- PÉREZ-NEVADO F, H ALBERGARIA, T HOGG & F GIRIO. 2006. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. **Int. J. Food Microbiol.** 108: 336-345.
- POLONELLI L, S CONTI & M GERLONI. 1991. Antibodies: antibiotic-like anti-idiotypic antibodies. **J. Med. Vet. Mycol.** 29: 235-242.
- POLONELLI L & G MORACE. 1983. Yeast nosocomial infections. **Ig. Mod.** 79: 315-334.
- POLONELLI L, C ARCHIBUSACCI, M SESTITO & G MORACE. 1983. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. **J. Clin. Microbiol.** 17: 774-780.
- POLONELLI L, G DETTORI, C CATTEL & G MORACE. 1987. Biotyping of mycelial fungus cultures by the killer system. **Eur. J. Epidemiol.** 3: 237-242.
- POLONELLI L, W MAGLIANI, S CONTI, L BRACCI, L LOZZI, P NERI, D ADRIANI, F DE BERNARDIS & A CASSONE. 2003. Therapeutic activity of an engineered synthetic killer anti-idiotypic antibody fragment against experimental mucosal and systemic candidiasis. **Infect. Immun.** 71: 6205-6212.
- POLONELLI L, M CASTAGNOLA, DV ROSSETTI & G MORACE. 1985. Use of killer toxins for computer-aided differentiation of *Candida albicans* strains. **Mycopathologia** 91: 175-179.
- POLONELLI L, R LORENZINI, F DE BERNARDIS & G MORACE. 1986. Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. **Mycopathologia** 96: 103-107.
- POLONELLI L, S CONTI, L CAMPANI, G MORACE & F FANTI. 1989. Yeast killer toxins and dimorphism. **J. Clin. Microbiol.** 27: 1423-1425.
- PROVOST F, L POLONELLI, S CONTI, P FISICARO, M GERLONI & P BOIRON. 1995. Use of yeast killer system to identify species of the *Nocardia asteroides* complex. **J. Clin. Microbiol.** 33: 8-10.
- SANGORRÍN MP, IE ZAJONSKOVSKY, CA LOPES, ME RODRIGUEZ, MR GIRAUDO DE VAN BROOK & AC CABALLERO. 2001. Killer behaviour in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from northwestern Patagonia (Argentina). 41: 105-113.
- SANTOS A & D MARQUINA. 2004. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. **Microbiology** 150: 2527-2534.
- SCHAAL KP & H REUTERSBERG. 1978. Numerical taxonomy of *Nocardia asteroides*, p. 53-62. In: M MORDASKI, W KURYLOWICZ & J JELJASZEWICZ (eds.). *Nocardia and Streptomyces*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- SCHMITT MJ. 1995. Cloning and expression of a cDNA copy of the viral K28 killer toxin gene in yeast. **Mol. Gen. Genet.** 246: 236-246.
- SCLAFANI RA & WL FANGMAN. 1984. Conservative replication of yeast double-stranded RNA by displacement of progeny single strands. **Mol. Cel. Biol.** 4: 1618-1626.
- SEKI T, E CHOI & D RYU. 1985. Construction of killer wine yeast strain. **Appl. Environ. Microbiol.** 49: 1211-1215.

- SOARES GAM & HH SATO. 2000. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L killer toxin. **Braz. J. Microbiol.** 31: 291-297.
- SOMERS JM & EA BEVAN. 1969. The inheritance of the killer character in yeast. *Genet. Res.* 13: 71-83.
- SREENIVAS RAO RS, K PRAKASHAM, S KRISHNA PRASAD, PN RAJESHAM, L SARMA & RAO VENKATESWAR. 2004. Xylitol production by *Candida* sp.: parameter optimization using Taguchi approach. **Process Biochemistry** 39: 951-956.
- SUGISAKI Y, N GUNGE, K SAKAGUCHI, M YAMASAKI & G TAMURA. 1985. Transfer of DNA killer plasmids from *Kluyveromyces lactis* to *Kluyveromyces fragilis* and *Candida pseudotropicalis*. **J. Bacteriol.** 164: 1373-1375.
- TREDoux HG, RP TRACEY & A TROMP. 1986. Killer factor in wine yeasts and its effect on fermentation. **S. Afr. J. Enol. Vitic.** 7: 105-112.
- TSUKAMURA M. 1969. Numerical taxonomy of the genus *Nocardia*. **J. Gen. Microbiol.** 56: 265-287.
- VAN VUUREN HJJ & BD WINGFIELD. 1986. Killer yeasts: cause of stuck fermentations in a wine cellar. **South Africa J. Enol. Viticult.** 7: 114-118.
- WALKER GM, AH McLEOD & VJ HODGSON. 1995. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. **FEMS Microbiol. Lett.** 127: 213-22.
- WOESE CR, O KANDLERT & ML WHEELIS. 1990. Towards a natural system of organisms Proposal for the domains *Archaea Bacteria* and *Eucarya*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 87: 4576-4579.
- WOODS DR & EA BEVAN. 1968. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.** 51: 115-117.
- YAMAGUCHI H, T HIRATANI, K IWATA & Y YAMAMOTO. 1982. Studies on the mechanism of antifungal action of aculeacin A. **J. Antibiot.** 35: 210-219.
- YAMAMOTO T, T IRATANI, H HIRATA, M IMAI & H YAMAGUCHI. 1986. Killer toxin from *Hansenula mrakii* selectively inhibits cell wall synthesis in a sensitive yeast. **FEBS Lett.** 197: 50-54.
- YAMAMOTO T, K UCHIDA & T HIRATANI. 1988. *In vitro* activity of the killer toxin from yeast *Hansenula mrakii* against yeast and mould. **J. Antibiotics** 41: 398-403.
- YOUNG TK. 1987. Killer yeasts, p. 131-164. *In: AH ROSE & JD HARRISON (eds.). The yeasts.* New York: Academic Press.
- YOUNG TW. 1981. The genetic manipulation of killer character into brewing yeast. **J. Inst. Brew.** 87: 292-295.
- YOUNG TW & M YORGIU. 1978. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. **Antonie van Leeuwenhoek** 44: 59-77.