

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Avaliação da ação sinérgica entre a nimesulida e os antifúngicos cetoconazol e nistatina sobre isolados clínicos cérvico-vaginais de *Candida* spp.

Francine Moreschi Bittencourt

Porto Alegre, junho de 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Avaliação da ação sinérgica entre a nimesulida e os antifúngicos cetoconazol e nistatina sobre isolados clínicos cérvico-vaginais de *Candida* spp.

Francine Moreschi Bittencourt

Prof^ª Adelina Mezzari

Orientadora

Bruna Pippi

Coorientadora

Porto Alegre, junho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos são destinados a todos que foram essenciais para a realização deste trabalho e para a conclusão da faculdade de farmácia. À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a todos responsáveis pela faculdade de farmácia pelas oportunidades oferecidas.

Ao departamento de análises clínicas da faculdade de farmácia por todo amparo e conteúdos aplicados que foram essenciais para a realização deste trabalho. Aos técnicos do departamento que deram todo o suporte necessário.

A todos do Grupo de pesquisa em micologia aplicada pela estrutura e suporte essenciais para a realização dos testes deste estudo. Em especial por me acolherem e se mostrarem disponíveis para resolver minhas dúvidas e angústias.

À minha co-orientadora, Bruna Pippi, que foi incansável para solucionar todas as dúvidas, planejamento dos experimentos e revisão do trabalho escrito. Assim como foi uma ótima amiga em todo trajeto percorrido para a realização deste trabalho. Muito obrigada pela dedicação.

À minha orientadora, Adelina Mezzari, que me deu a oportunidade de realização deste projeto e me ofereceu todo suporte e confiança que foram essenciais para concretizar o estudo. Por sempre estar disponível para tirar dúvidas, discutir resultados e fornecer suprimentos. Muito obrigada pela confiança e pela orientação, foram essenciais no meu desenvolvimento como profissional.

Agradeço aos meus amigos da faculdade e aos de fora também, por tornarem esses 6 anos de faculdade mais leves e mais divertidos. Por todos os dias de estudos em grupo e pelos incentivos a cada final de semestre.

E finalmente, agradeço às pessoas mais importantes, minha família. Muito obrigada pela educação, amor e segurança depositados em mim, sem vocês eu não estaria realizando o sonho de ter um diploma e não teria conseguido passar por todos os obstáculos. Esse trabalho é dedicado a vocês!

Este artigo foi elaborado segundo as normas da revista *World Journal of Pharmaceutical and Medical Research* apresentadas em anexo, na qualidade de “Artigo Original”. Adequações serão elaboradas após as correções e sugestões da banca revisora, como também a tradução para a língua inglesa.

**Avaliação da ação sinérgica entre a nimesulida e os antifúngicos
cetoconazol e nistatina sobre isolados clínicos cérvico-vaginais de
Candida spp.**

Francine Moreschi Bittencourt¹, Bruna Pippi², Luciane Noal Calil¹, Adelina Mezzari^{1*}

¹Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

***Endereço de correspondência: Adelina Mezzari**

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

E-mail: mezzari@ufrgs.br

RESUMO

A resistência aos antifúngicos em casos de candidíase vulvovaginal (CVV) afeta cada vez mais mulheres mundialmente, sendo uma recorrência em consultas ginecológicas. A necessidade de novas terapias eficazes e a dificuldade em introduzir antifúngicos no mercado farmacêutico, torna a combinação de fármacos uma estratégia terapêutica rápida e interessante para solucionar tal problema. O presente estudo tem como objetivo avaliar a associação da nimesulida, um anti-inflamatório não-esteroidal, com antifúngicos utilizados em tratamentos tópicos para candidíase vaginal (cetoconazol e nistatina). Secundariamente, nós relacionamos o perfil de suscetibilidade de isolados clínicos provenientes de unidades básicas de saúde do sul do Brasil. A metodologia de microdiluição em caldo foi utilizada para os testes de suscetibilidade, e o método de *Checkerboard* foi usado para avaliar o efeito sinérgico da nimesulida com os antifúngicos. Altas porcentagens de isolados resistentes aos antifúngicos testados foram observadas: 75% dos isolados foram resistentes ao fluconazol e 36,1% ao itraconazol, bem como 22,2% apresentaram baixa suscetibilidade ao cetoconazol e 55% à nistatina. A associação da nimesulida e cetoconazol demonstrou efeito sinérgico para 62,5% dos isolados de *Candida* spp. testados, incluindo isolados de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Por outro lado, a associação de nimesulida e nistatina resultou em 100% de indiferença.

Palavras-chave: resistência antifúngica, sinergismo, nimesulida, cetoconazol, nistatina candidíase.

INTRODUÇÃO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção oportunista causada pelo crescimento descontrolado de leveduras do gênero *Candida* trato genital feminino (Alizadeh M et al., 2017), sendo favorecida em indivíduos imunocomprometidos e quando há alterações na microbiota vaginal (Smeekens et al., 2013). A CVV afeta milhões de mulheres e é a causa mais comum de vaginite aguda na Europa, nos Estados Unidos e em alguns países tropicais (Paiva et al., 2012). Estima-se que aproximadamente 75% das mulheres em idade fértil são acometidas ao longo da vida e 5% delas apresentam candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), manifestando episódios sintomáticos 4 (quatro) ou mais vezes ao ano (Zhai et al., 2018).

Estudos demonstram que *C. albicans* é a espécie mais frequente, sendo responsável por 50-60% das CVV (Gunther et al., 2014; Bitew e Abebaw, 2018). Porém, as espécies não-*albicans* estão emergindo, especialmente nos episódios recorrentes, demonstrando uma situação preocupante devido à alta resistência desses micro-organismos aos antifúngicos (Basso Rangeli et al., 2012; Leal et al., 2016; Brandolt et al., 2017). A subjetividade dos sintomas e o grande desconforto causado aos pacientes levam ao uso descontrolado de antifúngicos sem o devido diagnóstico; esse uso indiscriminado contribui para a emergência de micro-organismos resistentes à terapia antifúngica (Santos et al., 2005; Izquierdo et al., 2015).

Devido ao crescente isolamento de cepas resistentes e à dificuldade de introduzir novos antifúngicos no mercado farmacêutico, a combinação de medicamentos torna-se uma estratégia terapêutica interessante (Fuentefria et al., 2018). O uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), como nimesulida, já vem sendo utilizado por alguns prescritores para amenizar os sintomas da candidíase (Costa-de-Oliveira et al., 2015; Sharma et al., 2015). A nimesulida é um inibidor seletivo das enzimas que sintetizam as prostaglandinas, as ciclooxigenases (COX), preferencialmente a COX-2. Além desse principal mecanismo de ação, possui outras propriedades bioquímicas responsáveis pela ação terapêutica. Dentre elas, inibição dos radicais tóxicos de oxigênio, diminuição da secreção de enzimas, como também a diminuição da liberação de histaminas (Araujo, 2012).

Tendo como base tais informações, o presente estudo busca analisar a ação antifúngica do fluconazol, itraconazol, cetoconazol, nistatina e nimesulida sobre

isolados de *Candida* spp. de origem cervico-vaginais. Ainda, com o objetivo de evidenciar o uso de anti-inflamatórios como tratamento complementar à terapia antifúngica, nós avaliamos a ação antifúngica da associação de nimesulida com cetoconazol e nistatina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados Fúngicos:

Um total de 36 isolados clínicos de *Candida* spp. foram incluídos nesse estudo. Os isolados são provenientes de coletas cérvico-vaginais e estão armazenados no Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. As espécies foram identificadas previamente pela técnica de microcultivo em lâmina e através de semeadura em ágar cromogênico (CHROMagar™, Difco). Antes dos experimentos, todos os isolados foram repicados em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol ((HIMEDIA) e incubados a 35°C por 24 h.

Antifúngicos e Anti-inflamatórios:

As soluções estoques de antifúngicos foram preparadas conforme preconizado pelo protocolo M27-A3 da *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Soluções estoque de fluconazol foram preparadas em água destilada, e soluções estoque de itraconazol, cetoconazol e nistatina, bem como a solução estoque do anti-inflamatório nimesulida, foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO; Nuclear, Brazil). Para os testes, os fármacos foram diluídos em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640; Sigma-Aldrich, EUA) tamponado com MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico; Sigma-Aldrich) e ajustado para pH 7, a fim de obter uma concentração máxima de 1% de DMSO.

Teste de suscetibilidade:

Os testes de suscetibilidade aos antifúngicos frente aos 36 isolados foram realizados através do método de microdiluição em caldo de acordo com as normas de padronização publicadas no documento M27-A3 da CLSI (CLSI, 2008). Diluições seriadas foram realizadas com meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA), obtendo-se as seguintes faixas de concentrações teste: 64 – 0,125 µg/mL (fluconazol e nistatina), 16 – 0,0312 µg/mL (cetoconazol e itraconazol) e 256 – 0,5 µg/mL (nimesulida). As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram definidas como as menores concentrações em que não se observou crescimento visível (nistatina) ou que se observou diminuição de 50% (azóis e nimesulida) do crescimento em 48 horas. Os critérios de definição de suscetibilidade ao fluconazol e itraconazol foram definidos conforme a CLSI M27-A3 (CLSI, 2008) levando em consideração as atualizações publicadas no documento M27-S4 (CLSI, 2012). Para o cetoconazol e nistatina, os critérios de suscetibilidade foram estabelecidos conforme estudos anteriores (Isham & Ghannoum, 2010; Diaz et al. 2016).

Avaliação da associação da nimesulida com antifúngicos pelo ensaio *Checkerboard*:

A interação da nimesulida com cetoconazol e nistatina foi analisada em 8 isolados de *Candida* spp. através do método *checkerboard* (Johnson et al. 2004). O ensaio permitiu avaliar 49 diferentes combinações entre o anti-inflamatório e os agentes antifúngicos. Os experimentos foram realizados em duplicata e incubados a 35 °C por 48 h. O efeito das combinações foi classificado pela determinação do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), expresso como a soma das concentrações inibitórias fracionadas (CIF), conforme definido pela seguinte equação:

$$\text{ICIF} = \text{CIF}_A + \text{CIF}_B = (\text{CIM}_A \text{ em combinação})/(\text{CIM}_A \text{ testado sozinho}) + (\text{CIM}_B \text{ em combinação})/(\text{CIM}_B \text{ testado sozinho})$$

onde CIM_A e CIM_B são os CIMs do agente antifúngico e do antiinflamatório, respectivamente (Mukherjee et al, 2005). Sinergismo foi definido quando $\text{ICIF} \leq 0,5$, indiferença quando $0,5 < \text{ICIF} \leq 4$ e antagonismo quando $\text{ICIF} > 4$ (Johnson et al., 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie de *Candida* mais frequentemente isolada de coletas vaginais é a *C. albicans*, correspondendo a aproximadamente 55% dos casos com sintomas clínicos (Gunther et al, 2014; Bitew and Abebaw, 2018). Entretanto, a emergência de espécies não-*albicans* e a relação dessas espécies com maiores incidências de resistência aos antifúngicos estão mudando a etiologia da candidíase (Leal et al, 2016). Das 36 amostras de *Candida* spp. avaliadas neste estudo, 36,1% foram de *C. albicans*, não correspondendo aos estudos epidemiológicos relatados na literatura (Zhai et al, 2018; Gunther et al, 2014; Leal et al, 2016; Bitew and Abebaw, 2018). Das espécies não-*albicans* a mais frequente foi a *C. glabrata* (27,7%), seguida de *C. krusei* (16,6%), *C. tropicalis* (8,3%), *C. parapsilosis* (8,3%) e *C. guilliermondii* (2,7%).

Estes isolados apresentaram suscetibilidade variável aos antifúngicos. As CIMs variaram de 1 a > 64 µg/mL para fluconazol, de 0,03 a > 16 µg/mL para cetoconazol, de 0,25 a > 16 µg/mL para itraconazol e de 2 a 8 µg/mL para nistatina. Em relação à nimesulida, nenhum isolado foi sensível a esse anti-inflamatório (CIM > 256 µg/mL). Os resultados dos testes de suscetibilidade para todos os fármacos avaliados estão representados na tabela 1.

Tabela 1. Valores de concentrações inibitórias mínimas (CIM) do fluconazol (FLC), cetoconazol (CEC), itraconazol (ITC) e nimesulida (NMS) frente isolados de *Candida spp.*

ESPÉCIE	ISOLADO	CIM (µg/mL)				
		FLC	ITC	CEC	NIT	NMS
<i>C. albicans</i> (n=13)	CA06	16*	0,5	16*	4*	>256
	CA07	>64*	0,5	16*	8*	>256
	CA09	32*	0,5	0,125	2	>256
	CA10	16*	0,5	0,125	2	>256
	CA11	16*	1*	NR	4*	>256
	CA12	16*	0,5	NR	4*	>256
	CA13	32*	1*	NR	4*	>256
	CA14	16*	1*	0,03	4*	>256
	CA15	8*	>16*	>16*	4*	>256
	CA16	4	>16*	>16*	2	>256
	CA17	8*	>16*	>16*	2	>256
	CA18	>64*	>16*	>16*	4*	>256
	CA19	8*	0,5	4	2	>256
<i>C. glabrata</i> (n=10)	CG02	>64*	0,5	2	2	>256
	CG04	16	1*	2	2	>256
	CG07	16	0,5	0,25	4*	>256
	CG08	1	0,25	0,5	2	>256
	CG09	>64*	>16*	4	2	>256
	CG13	2	0,5	0,125	2	>256
	CG15	2	0,5	0,125	2	>256
	CG17	>64*	1*	8	2	>256
	CG18	>64*	1*	32*	2	>256
CG20	0,5	0,25	0,03	2	>256	
<i>C. guilliermondii</i> (n = 1)	CGUI01	8	0,5	1	2	>256
<i>C. krusei</i> (n=6)	CK01	>64*	0,5	1	4*	>256
	CK02	>64*	0,25	0,5	2	>256
	CK03	16*	0,25	0,03	4*	>256
	CK04	>64*	0,5	1	8*	>256
	CK06	8*	0,5	0,06	4*	>256
	CK12	16*	0,5	0,03	4*	>256
<i>C. parapsilosis</i> (n=3)	CP01	4	0,125	0,03	4*	>256
	CP04	>64*	0,25	0,03	4*	>256
	CP11	8*	0,25	0,06	4*	>256
<i>C. tropicalis</i> (n=3)	CT01	>64*	4*	>16*	4*	>256
	CT03	16*	0,5	0,25	4*	>256
	CT04	>64*	1*	0,25	4*	>256

NR = Não realizado; *Resistentes ou cepas com baixa suscetibilidade.

Pode-se observar que 75% dos isolados foram resistentes ao fluconazol e 25% foram sensíveis dose-dependente. Nenhum dos isolados foi sensível a esse antifúngico. Em relação ao itraconazol e cetoconazol, 36,1% e 22,2% dos isolados foram resistentes, respectivamente. Ainda, aproximadamente 55% dos isolados de *Candida* spp. tiveram baixa suscetibilidade à nistatina, um antifúngico poliênico. Santos et al. (2005) encontraram ampla sensibilidade de *C. albicans* ao fluconazol, e as espécies não-*albicans* foram totalmente resistentes em pacientes com candidíase vulvovaginal recorrentes. Estudo realizado por de Feng et al. (2018) mostrou que 38,71% dos isolados de *Candida* spp. foram resistentes ao itraconazol. Já em estudo realizado por Pérez et al. (2016), todos os isolados de *Candida* testados foram suscetíveis à nistatina.

Atualmente, o tratamento para candidíase vulvovaginal se apoia na utilização de nistatina e derivados azólicos orais ou tópicos. Em casos de candidíase recorrente, impõe-se inicialmente regime de supressão com dose prolongada de antifúngico oral ou qualquer azólico tópico por sete a 14 dias, como o cetoconazol (Feuerschuette et al., 2010). Porém, como demonstrado aqui, isolados clínicos resistentes são frequentemente encontrados. A solução mais imediata para contornar tais problemas de resistência talvez seja a associação entre fármacos com o objetivo de potencializar a ação na clínica (Carillo-Muñoz et al., 2014). A investigação da eficácia de AINEs em combinação com antifúngicos tem mostrado grande valor na tentativa de combater a resistência microbiana (Yücesoy et al. 2000; Zhang et al., 2014). Para investigar o efeito sinérgico de nimesulida com cetoconazol e nistatina, foram selecionados isolados que apresentaram resistência ou baixa suscetibilidade aos antifúngicos testados. As CIMs da combinação, o ICIF e o tipo de interação obtidos no ensaio do *checkerboard* são demonstrados na tabela 2.

Tabela 2. Suscetibilidade in vitro de *Candida* spp. a nimesulida (NMS) combinada com cetoconazol (CEC) e nistatina (NIT).

ISOLADO	NMS + CEC				NMS + NIT			
	CIM da associação (µg/mL)				CIM da associação (µg/mL)			
	NMS	CEC	ICIF	Interação	NMS	NIT	ICIF	Interação
<i>C. albicans</i> CA07	4	2	0,13	SIN	256	2	0,75	IND
<i>C. albicans</i> CA18	32	2	0,09	SIN	4	4	1	IND
<i>C. glabrata</i> CG09	32	1	0,31	SIN	4	2	1	IND
<i>C. glabrata</i> CG18	4	2	0,07	SIN	4	4	1	IND
<i>C. krusei</i> CK01	256	0,25	1	IND	4	8	1	IND
<i>C. krusei</i> CK04	256	0,5	1	IND	4	8	1	IND
<i>C. tropicalis</i> CT01	16	0,5	0,06	SIN	4	4	1	IND
<i>C. tropicalis</i> CT04	4	0,25	1	IND	4	4	1	IND

ICIF: índice de concentração inibitória fracionada; SIN: sinergismo; IND: indiferença.

Através da análise dos dados podemos observar que a associação de cetoconazol e nimesulida resultou predominantemente em interação sinérgica, sendo esse efeito observado em 62,5% dos isolados de *Candida* spp. A associação obteve resultados relevantes para os dois isolados de *C. glabrata* e *C. albicans* testados, bem como para um dos isolados de *C. tropicalis*. Os isolados de *C. krusei* não demonstraram maior suscetibilidade frente à combinação. Por outro lado, a nistatina associada à nimesulida resultou em 100% de indiferença. Antagonismo não foi detectado em ambas as combinações. Tais resultados corroboram com estudos realizados por Yücesoy et al. (2000), onde verificou-se atividade sinérgica da combinação de fluconazol com outros AINEs, tais como salicilato de sódio, tenoxicam e diclofenaco sódico. Costa-de-oliveira et al. (2015) e Sharma et al. (2015) também constataram que a associação do AINE ibuprofeno com fluconazol é uma boa alternativa terapêutica para a reversão da resistência de espécies de *Candida* spp.

Durante a infecção, a presença de antígenos fúngicos levam à síntese de prostaglandinas, cuja cascata é ativada pelas COX, as quais são responsáveis pelo mecanismo da inflamação (Tsitsigiannis et al., 2005). O gênero *Candida* é capaz de produzir enzimas similares à COX dos mamíferos, as quais interferem no metabolismo fúngico, aumentam a transição de levedura para o estado hifal e contribuem para a virulência (Noverr et al., 2001). Sendo assim, a administração concomitante de inibidores das COX, como AINEs, com antifúngicos pode ser uma alternativa eficaz na terapia da candidíase. Desse modo, a utilização da nimesulida pode ter potencializado a ação do cetoconazol por bloqueio do crescimento fúngico e prevenção da transição para

o estado hifal, fator importante para a instalação da infecção. Além disso, há também as vantagens anti-inflamatórias desse fármaco em relação às manifestações clínicas da doença e, portanto, melhores resultados *in vivo* podem ser alcançados (Ashraf et al. 2015; Zhang et al., 2014).

CONCLUSÃO

Os dados obtidos, bem como o levantamento bibliográfico realizado, sugerem que os AINES têm papel importante e promissor no controle das infecções fúngicas ocasionadas por espécies de *Candida* spp. No presente estudo os resultados demonstraram que a combinação de nimesulida com cetoconazol pode ser útil para o tratamento de candidíase vulvovaginal, especialmente aquelas causadas por cepas resistentes aos azóis. No entanto, trabalhos pré-clínicos adicionais e estudos *in vivo* são necessários para definir seu uso clínico.

Referências

- Alizadeh M, Kolecka A, Boekhout T, Zarrinfar H, Nahzag MAG, Badiiee P, Rezaei-Matehkolaei A, Fata A, Dolatabadi S, Najafzadeh MJ. Identification of *Candida* species isolated from vulvovaginitis using matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Curr Med Mycol*, 2017, 3(4): 21-25
- Smeekens SP, Veerdonk FLV, Kullberg BJ, Netea MG. Genetic susceptibility to candida infections. *EMBO Mol Med*, 2013; 5, 805–813.
- Paiva LC, Vidigal PG, Donatti L, Svidzinski TI, Consolaro ME. 2012. Assessment of *in vitro* biofilm formation by *Candida* species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics. *Micron*. 43(2-3):497-502.
- Zhai Y, Liu J, Zhou L, Ji T, Meng L, Gao Y, Liu R, Wang X, Li L, Lu L, Cao Z. Detection of *Candida* species in pregnant Chinese women with a molecular beacon method. *Journal of Medical Microbiology*. 2018.
- Gunther LSA, Martins HPR, Gimenes F, Pimenta de Abreu AL, Consolaro MEL, Svidzinski TIE. Prevalence of *Candida albicans* and non-*albicans* isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. *Sao Paulo Med J*. 2014; 132(2):116-20
- Bitew A and Abebaw Y. Vulvovaginal candidiasis: species distribution of *Candida* and their antifungal susceptibility pattern. *BMC Women's Health*, 2018.
- Basso R, Silva NL, Pereira KB, Mezzari A, Fuentefria AM. Etiología de la candidiasis vulvovaginal recidivante en la Atención Primaria de Salud en Santa Catarina, Brasil. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2012; 46 (3): 399-404
- Leal MRD, Lima MCNPC, Klein SOT, Lordêlo P. Tratamento da candidíase vulvovaginal e novas perspectivas terapêuticas: Uma revisão narrativa. *Revista Pesquisa em Fisioterapia*. 2016 Nov;6(4):462-469
- Brandolt TM, Klafke GB, Gonçalves CV, Bitencourt JR, Martinez AMB, Mendes JF, Meireles MCA, Xavier MO. Prevalence os *Candida* spp. in cervical-vaginal samples and the *in vitro* susceptibility of isolates. *Brazilian Journal Of Microbiology* 48, 2017; 145-150.
- Santos Jr ID, Souza IAM, Borges RG, Souza LBS, Santana WJ, Coutinho HDM. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. *Scientia Medica*, Porto Alegre: PUCRS, v. 15, n. 3, jul./set. 2005.

IZQUIERDO, A. A.; MELHEM, M. S. C.; BONFIETTI, L. X.; TUDELA, J. L. R. Susceptibility test for fungi: Clinical and Laboratorial correlations in Medical Mycology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol.57, suplemento 19, p.57–64, 2015.

Fuentefria AM, Pippi B, Dalla Lana DF, Donato KK, de Andrade SF. 2018. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. *Lett Appl Microbiol*. 66(1):2-13. doi: 10.1111/lam.12820. Epub 2017 Dec 11.

Costa-de-Oliveira S, Miranda IM, Silva-Dias A, Silva AP, Rodrigues AG, Pina-Vaza C. Ibuprofen Potentiates the In Vivo Antifungal Activity of Fluconazole against *Candida albicans* Murine Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 59, n. 7, 2015.

Sharma M, Biswas D, Kotwal A, Thakuria B, Kakati B, Chauhan BS, Patras A. Ibuprofen-Mediated Reversal of Fluconazole Resistance in Clinical Isolates of *Candida*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2015 Jan, Vol-9(1): DC20-DC22

Araujo MAR. Hepatotxicidade associada à nimesulida: uma revisão da literatura. *Rev. Bras. Farm.* 93(3): 283-289, 2012.

Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI Document M27-A3. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008.

Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI Document M27-S4. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2012.

Isham N & Ghannoum MA. Antifungal activity of miconazole against recent *candida* strains. *Mycoses*. V. 53. n. 5. p. 434-7. 2010.

Diaz MC, Camponovo R, Araya I, Cerda A, Santander MP, CarrilloMuñoz AJ. Identificación y sensibilidad antifúngica in vitro de *Candida* spp. de origen vaginal a fluconazol, clotrimazol y nistatina. *Rev Esp Quimioter* 2016;29(3): 151-154

Johnson, M., Macdougall, C., Ostrosky-Zeichner, L., Perfect, J. and Rex, J. (2004) Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 693–715.

Feng W, Yang J, Yang L, Li Q, Zhu X, Xi Z, Qiao Z and Cen Z. Research of Mrr1, Cap1 and MDR1 in *Candida albicans* resistant to azole medications. *Experimental And Therapeutic Medicine* 15: 1217-1224, 2018.

Pérez EM, Paniagua-Contreras GL, Rodríguez-Purata P, Vaca-Paniagua F, Vázquez-Villaseñor M, Díaz-Velásquez C, Uribe-García A, Vaca S. High Virulence and Antifungal Resistance in Clinical Strains of *Candida albicans*. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2016.

Feuerschuette OHM, Silveira SK, Feuerschuette I, Corrêa T, Grando L, Trepani A. Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico. *FEMINA*, Fevereiro 2010, vol 38, nº2.

Carrillo-Muñoz, AJ., Finkelievich, J., Tur-Tur, C., Eraso, E., Jauregizar, N., Quindós, G., Giusiano, G. Combination antifungal therapy: A strategy for the management of invasive fungal infections. *Revista Española de Quimioterapia*, v. 27, n.3., p 141-158, 2014.

Yücesoy M, Oktem IM, Gülay Z. In-vitro synergistic effect of fluconazole with nonsteroidal anti-inflammatory agents against *Candida albicans* strains. *J Chemother*. 2000 Oct;12(5):385-9.

Zhang, L., She, X., Merestein, D., Wang, C., Hamilton, P., Blackmon, A., Hu, Haihong Calderone, R., Li, D. Fluconazol Resistance Patterns in *Candida* Species that colonize women with HIV infection. *Current Therapeutic Research*.v.76, p.8-89, 2014.

Tsitsigiannis, DI., Bok, W., Andes, D., Nielsen, KF., Frisvad, JC., Keller, NP. Aspergillus Cyclooxygenase-like Enzymes are associated with prostaglandin productions and virulence. *Infection and Immunity*, v. 73, n.8, p.4548-4559, Agosto, 2005

Noverr MC, Phare SM, Toews GB, Coffey MJ, Huffnagle GB. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. *Infect Immun*. 2001 May;69(5):2957-63.

Ashraf, A., Youri, F., Taha, N., El-Waly, OA., Ramadam, AE., Ismail, E., Hamada, R., Khalaf, M., Refaee, M., Ali, S., Madyn, A., & El-Baky, RMA. Effect of Some Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Growth, Adherence and Mature Biofilms of *Candida* spp.. *American Journal of Microbiological Research*, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2015.

MANUSCRIPT STRUCTURE

RESEARCH ARTICLE FORMAT

The preferred format of all manuscripts are in MS office (2003 or above). Manuscript should be concisely typewritten in 1.5 spaces in A4 sized sheets. The pages shall be numbers consequently. Only on one side, with a 1" margin on all sides. The manuscript shall be prepared in Times New Roman using a font size of 12 and title shall be font size of 14, bold space capitals. All section titles in the manuscript shall be in font size 12, bold face capitals and subtitles in each section shall be in font size 12, bold face lower case. Illustrations (Figures & Tables) must be inserted at appropriate place in the article. Standard International Units should be used throughout the text. Pages should be numbered properly. There shall not be decorative borders anywhere in the text including the title page. The manuscript should be starting with the title page and the text should be arranged in the following order:

- Title Page
- Abstract
- Keywords
- Introduction
- Materials and Methods
- Results and Discussion
- Conclusion
- Acknowledgements
- References

Title Page

The title should be as short as possible on the first page and provide precise information about the contents. The title should be followed by full names of author (s), affiliations of author (s) and institutional addresses.

Authors and Co-Authors Details and Their Affiliations

Each author must provide their full name including their forenames and surname. The Corresponding Author of the manuscript must be marked with an asterisk*, and should be listed first. In addition the corresponding author must include Telephone and E-mail

address at the bottom left corner of the title page. If any of the co-authors are from different organizations, their addresses too should be mentioned and indicated using numbers after their names. Maximum 6 authors should be allowed.

Abstract

Provide on a separate page an abstract of not more than 150-250 words. A concise and factual abstract is required. The Abstract should be informative and completely self-explanatory, briefly present the topic, state the scope of the experiments, indicate significant data, and point out major findings and conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, standard nomenclature should be used and abbreviations and references should be avoided.

Keywords

Provide three to six appropriate keywords after the abstract.

Materials and Methods

It should be complete enough to allow experiments to be reproduced. All the procedures should be described in detail, previously published procedures should be cited, and important modifications of published procedures should be mentioned briefly. Capitalize trade names and include the manufacturer's name and address. Subheadings should be used. Methods in general use need not be described in detail.

Results

Results and their significance should be presented clearly and concisely, preferably in the form of graphs and tables which should be self explanatory.

Discussion

It should contain a critical review of the results in the light of relevant literature. Results and Discussion may be combined.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

Acknowledgement

Acknowledgements should be placed in a separate section after the conclusion. If external funding has been obtained for the study, then that should be mentioned under a separate header “Funding”, after the acknowledgements.

References

The authors are responsible for the accuracy of the bibliographic information. It must be numbered consecutively in the order that they are cited in the text and designated by superscript with square brackets after the punctuation marks. ([X]) A list should be included on separate 1.5spaced pages at the end of the text. For the proper abbreviations of the journal titles, refer to “Chemical Abstracts”. The style and punctuation of the references should confirm to the following examples:

Journal references

1. Cantarelli MA, Pellerano RG, Marchevsky EJ, Camina JM. (Title of article). *Anal Sci*, 2011; 27(1): 73-8.
2. Sather BC, Forbes JJ, Starck DJ, Rovers JP. (Title of article). *J Am Pharm Assoc*, 2007; 47(1): 82-5.

Books

- Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B and Kinzler KW (eds.). *The Genetic Basis of Human Cancer*, New York; McGraw-Hill: 2002, pp. 93-113.
- Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2nd ed., New York; John Wiley and Sons: 2001.

Patents

- Aviv H, Friedman D, Bar-Ilan A, Vered M. US Patent, US 5496811, 1996.

Websites

- Database of Natural Matrix Reference Materials, Compilation prepared by International Atomic Energy Agency (IAEA),

<http://www.iaea.org/programmes/nahunet/e4/nmrm/browse.htm/>. For other types of citation, please see “Uniform Requirement for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References” at www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Tables

- These should be numbered with Arabic numerals. Each table should be typed using a table format (i.e., each variable must be typed into a separate cell in the table). The title should be typed at the top of the table in the sentence case format, i.e., only the first name should be in capital letters; as appropriate. Any footnote should be typed at the bottom of the table in italic.

Illustrations and Figures

Figures must be numbered independently of tables, multimedia, and 3D models and cited as the relevant point in the manuscript text, e.g. "Fig. 1", "Fig. 2", etc. All figures including photographs should be numbered consecutively in Arabic numerals in the order of their appearance in the text and bear a brief title in lower case bold face letters below the figure. Do not duplicate data by presenting it both in the text and in a figure. For any figure directly extracted from previously published materials, you must have written permission from the publisher of that figure for reprint use. A copy of that permission release must be submitted with your article.

REVIEW ARTICLES

Review articles should not be more than 25 pages and contain comprehensive coverage of relevant literature. Review articles should preferably be written by scientists who have in-depth knowledge of the topic. All format requirements are similar to those applicable to Research papers. Review articles need not to be divided into sections such as Materials and methods, and Results and discussion, but should definitely have an abstract and introduction.

SHORT COMMUNICATIONS

The research and technical communications section of this journal (maximum 3,000 words) is open to interesting results worthy of publication without requiring extensive introduction and discussion. This section should be organized as follows: Abstract, Introduction, Materials and methods, Results and discussion (combined). Not more than 10 references should be provided. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as for research papers. Brevity of presentation is essential for this section.

Note: Figures and tables should be included at appropriate place in the manuscript

Chemical Terminology: The chemical nomenclature used must be in accordance with that used in the Chemical Abstracts

Biological Nomenclature: Names of plants, animals and bacteria should be in *italics*.

Enzyme Nomenclature: The trivial names recommended by the IUPAC-IUB Commission should be used. When the enzyme is the main subject of a paper, its code number and systematic name should be stated in its first citation in the paper.

Symbols and Abbreviations: Use only standard abbreviations. The use of non-standard abbreviations can be extremely confusing to readers. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.

ETHICAL MATTERS

Authors involving in the usage of experimental animals and human subjects in their research work should seek approval from the appropriate Institutional Animal Ethics Committee in accordance with "Principles of Laboratory Animal Care". The material and methods section of the manuscript should include a statement to prove that the investigation was approved and that informed consent was obtained.

PUBLICATION MALPRACTICE

The WJPMR Journal is committed to upholding the highest standards of publication ethics and takes all possible measures against any publication malpractices. All authors submitting their works to the WJPMR journal for publication as original articles attest that the submitted works represent their authors' contributions and have not been copied or plagiarized in whole or in part from other works. The authors acknowledge that they

have disclosed all and any actual or potential conflicts of interest with their work or partial benefits associated with it. In the same manner, the WJPMR journal is committed to objective and fair double-blind peer-review of the submitted for publication works and to prevent any actual or potential conflict of interests between the editorial and review personnel and the reviewed material. Any departures from the above-defined rules should be reported directly to the Editors-in-Chief, who is unequivocally committed to providing swift resolutions to any of such a type of problems.

AUTHORSHIP

A manuscript will be considered for the publication based on the below understanding:

1. All named authors should agree to its submission
2. It is not currently being considered for the publication by another journal
3. If the paper is accepted, it will not be subsequently published in the same or similar form in any language without the consent of publishers Any changes to the author list after submission, viz., a change in the order of the authors, deletion or addition of the authors needs to be approved by a signed letter from each author.

COPYRIGHT

Submission of the manuscript represents that the manuscript has not been published previously and is not considered for publication elsewhere. Authors would be required to sign a Copy Right Transfer Agreement Form once the manuscript is accepted.

GALLEY PROOFS

Unless indicated otherwise, galley proofs are sent to the address given for correspondence. It is the responsibility of the corresponding author to ensure that the galley proofs are returned without delay.

PRIVACY STATEMENT

The names and email addresses entered in this journal site will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be made available for any other purpose or to any other party.

AUTHOR FEES

This journal charges the following author fees.
Article Submission: 0.00 (INR)

Authors are required to pay zero rupees for an Article Submission never pay Fee as part of the submission process to contribute to review costs. If this paper is accepted for publication, you will be asked to pay an Article Publication Fee to cover publications costs.

