



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Catarina de Almeida Marques Liberal

Relatórios de estágio e Monografia intitulada “The effect of Glutamate in cases of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in the newborn: New therapies” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Capitolina Pinho, da Dra. Alessandra Stancari e do Professor Doutor Alcino Leitão e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Catarina de Almeida Marques Liberal

Relatórios de estágio e Monografia intitulada “The effect of Glutamate in cases of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in the newborn: New therapies” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Capitolina Pinho, da Dra. Alessandra Stancari e do Professor Doutor Alcino Leitão e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2020

Eu, Ana Catarina de Almeida Marques Liberal, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2015231755, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “The effect of Glutamate in cases of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in the newborn: New therapies” apresentadas à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 21 de outubro de 2020.

Ana Catarina de Almeida Marques Liberal

(Ana Catarina de Almeida Marques Liberal)

“The man who moves a mountain begins by carrying away small stones.”

Confucius

AGRADECIMENTOS

Apesar de sermos seres individuais cheios de vontade de alcançar as nossas metas e sucessos, tanto nos momentos de fraqueza como de felicidade, procuramos partilhá-los com os pilares mais importantes da nossa vida. Nestes marcos da nossa caminhada, é inevitável recordar os sorrisos e as gargalhadas partilhadas, os ombros emprestados, as lágrimas amparadas, todo o apoio recebido e o orgulho demonstrado que nos motiva e preenche o coração.

Primeiramente, agradeço aos meus pais que, para além de me terem proporcionado uma vida repleta de oportunidades, me lembram constantemente, “o único obstáculo entre ti e uma vida de sucesso está na tua cabeça” e “não te conformes, sonha”.

Agradeço à minha irmã, que apesar de todas as “turras” é a minha maior alegria, motivação e orgulho.

Agradeço aos meus avós que durante esta minha caminhada sempre me apoiaram e acarinharam da melhor forma.

Deixo um enorme obrigada a toda a equipa da Farmácia Figueiredo que me acolheu, ensinou e apoiou numa etapa muito importante da minha vida, tanto a nível académico como pessoal.

Agradeço ao Professor Doutor Alcino Leitão por ter partilhado esta etapa comigo e ter sempre mostrado total disponibilidade para me ajudar.

Agradeço às minhas estrelecas, Bea, Jéssica e Joana, e a todos os restantes amigos de Coimbra por me acompanharem nestes “anos verdes”, sem dúvida que vos levo comigo para a vida.

Por último, escrevo o meu maior agradecimento, à mais recente flor do meu jardim. Obrigada por teres deixado em mim os traços que mais me orgulho de ter, por me mostrares a bondade, a resiliência e o cuidado pelo outro. Obrigada por seres a minha “maior fã” e mostrares um orgulho extremo tanto pelas minhas grandes conquistas como pelas mais minimalistas. Obrigada por seres o sorriso que mais me aconchegava o coração nos dias mais escuros. Obrigada, principalmente, pelo amor incondicional, por mostrares que uma avó é, sem dúvida, uma segunda mãe, não tivessem sido os teus braços o segundo colo a proteger-me quando cheguei a este mundo. Sei que estás a guardar-me, a iluminar-me e a festejar esta vitória comigo, estejas onde estiveres.

Termino os meus agradecimentos citando uma grande figura, Martin Luther King, “*We cannot walk alone*”. Eu, certamente, não caminhei, nem nunca caminharei, sozinha.

Obrigada!

ÍNDICE

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

LISTA DE ABREVIATURAS	8
1. INTRODUÇÃO	9
2.1. Forças.....	10
2.1.1. Equipa	10
2.1.2. Comunicação.....	11
2.1.3. Preparação Individualizada da Medicação (PIM).....	12
2.1.4. Medicação Homeopática	12
2.1.5. Fitoterapia e Aromaterapia	13
2.1.6. Indicação Farmacêutica	14
2.1.7. Seguimento Farmacoterapêutico.....	15
2.1.8. Educação/Sensibilização para a Saúde	16
2.1.9. <i>Cross-Selling</i> e <i>Up-Selling</i>	17
2.1.10. Marketing Farmacêutico	18
2.2. Fraquezas	19
2.2.1. Puericultura.....	19
2.2.2. Preparação de Manipulados.....	19
2.3. Oportunidades.....	20
2.3.1. Formações.....	20
2.3.2. Implementação do novo programa Sifarma 2020®	20
2.3.3. Metodologia <i>Kaizen</i>	21
2.4. Ameaças.....	21
2.4.1. Medicamentos esgotados.....	21
2.4.2. Pandemia COVID-19.....	22
3. CONCLUSÃO	23

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA HOSPITALAR

LISTA DE ABREVIATURAS	31
1. INTRODUÇÃO	32
2. POLICLINICO S.ORSOLA-MALPIGHI	33
2.1. Laboratório de Galénica	33
2.2. IDS	34
3. ANÁLISE SWOT	36
3.1. Forças.....	36
3.1.1. Preparações galénicas estéreis e não estéreis	36
3.1.2. Ensaios Clínicos.....	37
3.2. Fraquezas	37
3.2.1. Planeamento/Duração do estágio.....	37
3.2.2. Barreira Linguística	38
3.3. Oportunidades.....	38
3.4.1. Formação contínua	38
3.4. Ameaças.....	39

3.4.1. Pandemia COVID-19.....	39
3.4.2. Distanciamento do doente.....	39
4. CONCLUSÃO.....	40

MONOGRAFIA “The effect of glutamate in cases of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in the newborn: New Therapies”

Index of figures.....	42
Index of tables.....	42
Abbreviations.....	43
Resumo.....	45
Abstract.....	46
1. Introduction.....	47
2. Fetal Brain Injury.....	48
3. Brain Development.....	48
4. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy.....	49
4.1. Pathophysiology.....	49
4.2. HIE phases.....	50
4.2.1. Acute Phase.....	50
4.2.2. Latent Phase.....	51
4.2.3. Secondary Phase.....	51
4.2.4. Tertiary Phase.....	52
5. Glutamate.....	53
5.1. Glutamate as a neurotransmitter.....	53
5.2. Glutamate excitotoxicity.....	55
6. Methods of evaluation.....	56
6.1. Magnetic Resonance Imaging (MRI).....	56
6.2. Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS).....	57
6.3. Amplitude- integrated electroencephalography (aEEG).....	59
7. Hypothermia as a Conventional Therapy.....	60
8. New Therapies.....	61
8.1. Magnesium Sulfate.....	61
8.2. Cannabinoids.....	62
8.3. Xenon.....	63
8.4. Neurosteroids.....	63
8.4.1. Neurosteroids as modulators of the NMDA receptor.....	64
9. Conclusion.....	66
10. Bibliography.....	67

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

FARMÁCIA FIGUEIREDO



farmácia
figueiredo

Orientado pela Dra. Capitolina Pinho

LISTA DE ABREVIATURAS

BPF: Boas Práticas Farmacêuticas

CDOF: Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos

FF: Farmácia Figueiredo

FFUC: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

MICF: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MSRM: Medicamento Sujeito a Receita Médica

OE: Óleo essencial

OMS: Organização Mundial de Saúde

PIM: Preparação Individualizada de Medicação

SNS: Serviço Nacional de Saúde

SWOT: Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades e Ameaças, do Inglês *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. INTRODUÇÃO

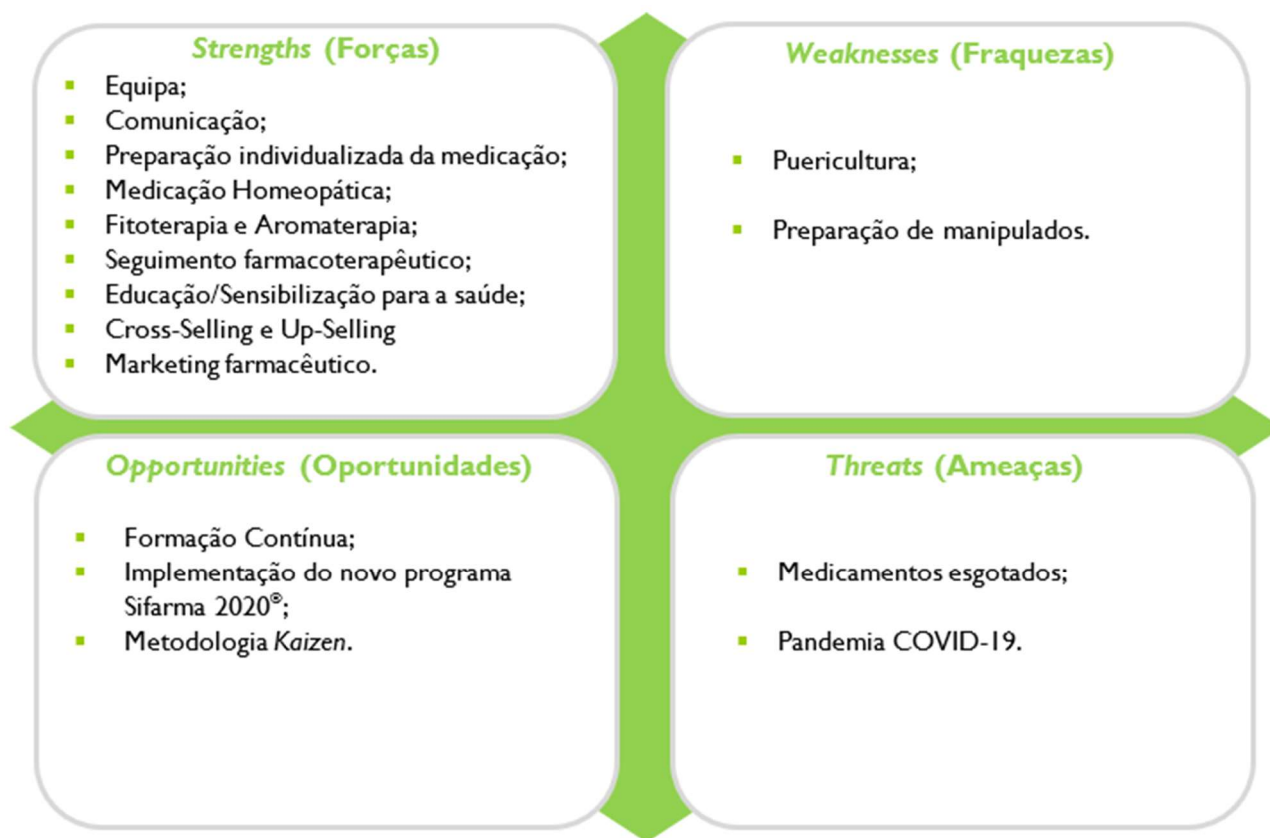
Atualmente, a farmácia comunitária é considerada um local de ligação primordial entre a sociedade e o acesso a cuidados de saúde, sendo assim, crucial no âmbito da manutenção do bem-estar e da saúde pública. O farmacêutico, como profissional de saúde e especialista do medicamento, tem o dever de providenciar os melhores cuidados e promover a educação para a saúde da sociedade, de modo a satisfazer as necessidades dos seus utentes de forma segura e eficaz e tendo sempre o doente como foco principal. Desta forma, numa farmácia comunitária, o papel do farmacêutico revela uma enorme importância acompanhada de uma extrema responsabilidade, e por isso mesmo, é decisivo que estes profissionais exerçam a sua atividade de forma competente, ética e rigorosa, sem nunca esquecer a necessidade de uma aprendizagem técnica e científica contínua, promovendo uma utilização racional e segura do medicamento e uma relação utente-farmacêutico estabelecida com base na confiança pelos conhecimentos do farmacêutico [1].

O curso de MICF, ao proporcionar um estágio curricular em farmácia comunitária aos seus estudantes, possibilita um primeiro contacto com o mercado de trabalho, garante a consolidação e aplicação de conhecimentos teóricos e práticos adquiridos durante 5 anos de estudos e ainda a obtenção de novas competências essenciais para a integração no mundo profissional.

Deste modo, realizei entre o período de 5 de maio a 4 de setembro de 2020 o meu estágio curricular em farmácia comunitária, como parte da equipa da Farmácia Figueiredo (FF), na cidade de Coimbra, sob a orientação da Dra. Capitolina Figueiredo Pinto, destacando igualmente todo o apoio e ensino constante transmitido pela restante equipa técnica.

O presente relatório de estágio, estruturado sob a forma de análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), visa retratar a minha experiência e adaptação ao ambiente profissional, a aquisição e aplicação de conhecimentos adquiridos durante este período de aprendizagem e todas as adversidades superadas que me possibilitaram um crescimento a nível humano e profissional, tendo em conta uma reflexão crítica e introspetiva.

2. ANÁLISE SWOT



Esquema I: Quadro-resumo da análise SWOT.

2.1. Forças

2.1.1. Equipa

O valor e sucesso da FF assenta, fundamentalmente, na sua equipa de profissionais jovem, dinâmica e trabalhadora que tem sempre como foco principal a satisfação do utente. A constante disponibilidade, simpatia e humanismo são os fatores principais para uma excelente relação utente-farmacêutico, e é por esse motivo que esta farmácia conta com um largo grupo de utentes fiéis e com plena confiança nesta equipa de farmacêuticas. Estas qualidades, aliadas a um sólido conhecimento científico em todas as vertentes associadas ao medicamento, contribuíram para um estágio enriquecedor e repleto de momentos de aprendizagem.

Considero que o facto de ter iniciado o estágio enquanto as profissionais da FF trabalhavam em equipas espelho, ou seja, com um número reduzido de farmacêuticas, me proporcionou uma integração rápida nas tarefas do quotidiano da farmácia. Tendo sempre como objetivo principal ajudar ao máximo a equipa da FF, “obriguei-me” a aproximar o meu trabalho daquele realizado pelas profissionais com quem estagiei neste período complicado o mais rápido possível, familiarizando-me num curto espaço de tempo com as rotinas e tarefas

que eram meu dever exercer. De salientar que, como qualquer humano, cometi lapsos, mas, para além de nunca me ter sentido não acompanhada em nenhuma tarefa ou atendimento, a primeira intervenção de qualquer membro da equipa sempre foi no sentido de me corrigir de forma construtiva para que não voltasse a cometer o mesmo erro. O tipo de ensino realizado na FF contribuiu para que me sentisse integrada na equipa, senti que todo o meu trabalho era valorizado e que a minha opinião contava, não sendo considerada uma “mera” estagiária. Assim, destaco a equipa da Farmácia Figueiredo como um dos fortes motivos para a uma experiência de estágio francamente positiva, desafiante e enriquecedora.

2.1.2. Comunicação

Atualmente, o poder da comunicação é uma das *soft skills* mais procuradas pelas equipas e empresas na hora do recrutamento. Na farmácia comunitária, tanto a comunicação com o utente como entre os diferentes membros da equipa são dois fatores determinantes para o bom funcionamento de uma farmácia.

Durante o meu estágio adquiri o hábito de anotar todos os recados que me deixavam, pelo telefone ou pessoalmente, de forma a não me esquecer de comunicar a mensagem a todas as farmacêuticas de serviço, de forma a evitar falhas de comunicação. Como exemplo, vejamos o seguinte caso:

CASO I – Comunicação

Através de um projeto da Academia Glintt[®], a FF implementou a metodologia *Kaizen*, com o intuito de manter o espírito de melhoria contínua. Uma das mudanças efetuadas foi a reorganização das gavetas do balcão de atendimento, de forma a aumentar a acessibilidade aos medicamentos mais vendidos, diminuindo assim o tempo de espera do utente.

Para além de ter tido a oportunidade de auxiliar na análise de compra e vendas de cada produto, de forma a escolher quais os medicamentos que deveriam estar mais acessíveis, responsabilizei-me por fazer um “mapa” das gavetas de atendimento para comunicar a todas as colegas a nova localização dos produtos (Anexo 1).

2.1.3. Preparação Individualizada da Medicação (PIM)

O sistema de preparação individualizada da medicação (PIM) tem como principal objetivo auxiliar os utentes a reduzir os erros associados à administração de grandes quantidades de medicamentos, como a duplicação ou esquecimento da toma, reunindo a totalidade da medicação num *blister* descartável e de fácil perceção e utilização (Anexo 2).

Na FF está disponível o serviço de PIM, sendo majoritariamente realizado para instituições que acolhem pacientes com inúmeras patologias diferentes, o que se reflete em mapas terapêuticos extensos que requerem o máximo de atenção no momento de preparar os *blisters* semanais. De realçar que o sistema de PIM na FF é feito de forma rigorosa, seguindo um protocolo de acordo com as Boas Práticas Farmacêuticas (BPF) realizado por farmacêuticas, sendo de leitura obrigatória para qualquer estagiário que proceda à realização desta tarefa.

A preparação dos *blisters* para as instituições foi, sem dúvida, um dos desafios que mais me cativou neste estágio. Considerando-me uma pessoa que gosta de cuidar do outro, não havia tarefa que me desse mais satisfação de realizar com a máxima responsabilidade e dedicação.

Considero que foi uma mais-valia a vários níveis, como na relação entre o nome comercial do medicamento e o princípio ativo e a verificação de que os profissionais que efetuam os mapas terapêuticos respeitam o “horário ideal” para a toma de certos medicamentos.

2.1.4. Medicação Homeopática

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a palavra homeopatia nasceu com a aglutinação de dois termos gregos, *hómolos* que significa similar, e *pathos* que significa doença, e consiste numa abordagem baseada na doutrina “*Similia similibus curantur*”, ou seja, semelhante cura semelhante [2].

A homeopatia assenta em três princípios fundamentais:

- ❖ Princípio da Semelhança: Utilização de substâncias, sob a forma diluída, capazes de causar sintomas na mente e no corpo de um indivíduo saudável semelhantes aos de um indivíduo doente, potenciando uma resposta curativa inata [2].
- ❖ Lei da Infinitesimalidade: Os medicamentos homeopáticos apresentam uma concentração muito reduzida, pois são conseguidos através de diluições sucessivas do composto original [2].
- ❖ Lei Holística do Ser: Na doutrina da homeopatia é fundamental compreender a totalidade dos sintomas de cada indivíduo [2].

Embora os portugueses não procurem muito a corrente homeopática, existem muitos estrangeiros residentes em Portugal que tiveram um primeiro contacto com a homeopatia nos seus países natais e pretendem continuar a investir nesta medicina alternativa.

Acredito que, tal como eu, a maioria dos farmacêuticos não costumam aconselhar medicamentos homeopáticos por falta de conhecimento científico neste tipo de medicina alternativa. Considero que foi de extrema importância o primeiro contacto que tive com a homeopatia na FF, pois durante o meu percurso académico não adquiri o conhecimento necessário para formular uma opinião fundamentada desta medicina não convencional.

Em suma, como futura farmacêutica, considero que nós, especialistas do medicamento, temos o dever de adquirir o máximo de conhecimento não só na medicina convencional, mas também na medicina não convencional, para podermos satisfazer as necessidades de todo o tipo de utentes com o maior rigor científico possível. Tendo isto em mente, acredito que sendo o medicamento homeopático um medicamento vendido em farmácia, a área da homeopatia devia ser mais fundamentada durante o percurso académico dos estudantes de MICEF.

2.1.5. Fitoterapia e Aromaterapia

A ação brutal e breve das drogas químicas e os efeitos secundários causados frequentemente explicam, de certo modo, o desencanto da sociedade pela medicação convencional alopática. Assim, começa a existir alguma curiosidade em medicações eficazes, simples e mais naturais, uma tendência atual que provocou o renascer da fito-aromaterapia científica.

A aromaterapia utiliza o poder curativo dos óleos essenciais (OE), um princípio ativo natural que é extraído de certas plantas aromáticas e dá origem, posteriormente, a um concentrado muito potente, no tratamento de diversos transtornos a nível físico, emocional, mental e energético. Estes OE são maioritariamente obtidos por destilação por vapor de água, sob baixa pressão, um processo delicado que exige experiência e uma supervisão constante, de forma a conseguir recolher a quintessência da planta, sem a alterar, e obter um OE de qualidade.

Devido à complexa estrutura dos OE, os mesmos não apresentam apenas uma única propriedade terapêutica, mas sim múltiplas, tornando possível efetuar sinergias e potenciações e proporcionando uma terapêutica individualizada. A elevada concentração em que os OE se apresentam, mesmo sendo considerados “naturais”, torna necessário que os mesmos só sejam

utilizados após serem aconselhados por profissionais de saúde que apresentem conhecimentos científicos suficientes para fazer uma indicação de utilização consciente, pois a ingestão anárquica pode levar a incidentes e consequências graves.

A equipa da FF tem um forte conhecimento na área de aromaterapia, tendo o poder de aconselhar aos seus utentes produtos à base de OE para um tratamento seguro e eficaz. Durante o meu estágio presenciei vários atendimentos onde foram indicados produtos aroma terapêuticos o que, juntamente com as duas formações em aromaterapia que frequentei, promoveu vários momentos de ensino relativamente ao uso de OE como auxiliares preciosos da medicação alopática.

2.1.6. Indicação Farmacêutica

Segundo as BPF o conceito de indicação farmacêutica pode ser descrito como a “*seleção de um medicamento não sujeito a receita médica ou de eventual tratamento não farmacológico com o objetivo de aliviar ou resolver um problema de saúde considerado como um transtorno menor ou sintoma menor, entendido como problema de saúde de carácter não grave, autolimitante, de curta duração, que não apresente relação com manifestações clínicas de outros problemas de saúde do doente.*” [3].

A farmácia comunitária é, sem qualquer dúvida, o principal elo de ligação entre o doente e os cuidados de saúde, pois em situações de menor gravidade, o utente aproveita a boa localização, o menor tempo de espera e o aconselhamento gratuito disponível para obter a ajuda que precisa. Tendo isto em mente, considero que a atividade de indicação farmacêutica, para além de ser o serviço mais efetuado numa farmácia, é o dever do farmacêutico que confere mais valor à profissão de farmacêutico.

Durante o meu estágio assisti a diversos atendimentos em que a indicação farmacêutica foi crucial para um atendimento de sucesso. Também existiram alguns atendimentos onde senti que já reunia conhecimentos suficientes para realizar uma indicação farmacêutica de forma segura, mas nunca o fiz sem antes confirmar a minha ideia com um dos membros da FF.

De realçar que nem sempre é possível satisfazer as necessidades de todos os utentes, ou porque o medicamento que necessita é um medicamento sujeito a receita médica (MSRM) e não estamos autorizados a cedê-lo sem receita ou porque, para o bem do doente, não devemos ceder qualquer tipo de medicação, mas sim encaminhar para o médico, como no caso descrito de seguida.

CASO 2 – Indicação Farmacêutica

Um utente do sexo feminino, com idade entre os 50 e os 60 anos, já na menopausa, dirigiu-se à FF e solicitou um produto à base de isoflavonas de soja que tomava habitualmente. Após constatar que não tinha disponível na farmácia o produto em questão, averigui se poderia encomenda-lo para o dia seguinte, contudo ele estava esgotado. Com o auxílio de duas doutoras conversámos com a utente, tentando resolver a situação, e indicámos um outro produto específico para o alívio dos sintomas da menopausa, porém a utente insistiu que já tinha experimentado inúmeras alternativas e que o único suplemento que aliviava os sintomas era aquele que estava esgotado.

No final da indicação farmacêutica, salientámos que, se a utente tivesse historial de cancros hormono-dependentes na família, como cancro da mama ou do ovário, devia evitar suplementos à base de soja, pois poderia aumentar a probabilidade de desenvolver um problema oncológico. Depois deste aviso, a utente confidenciou que, para além da mãe ter sofrido de cancro da mama e avó de cancro do ovário, ela tinha marcado uma consulta no ginecologista porque há dois meses que andava a ter hemorragias como se «tivesse o período outra vez» (sic).

Assim, todas concordámos em não indicar nenhum produto à utente, apenas que ela se dirigisse ao médico para ser avaliada, pois podia revelar-se um problema grave, claramente fora do nosso âmbito de atuação.

2.1.7. Seguimento Farmacoterapêutico

Segundo as BPF o Seguimento farmacoterapêutico pode ser definido como “a prática profissional em que o Farmacêutico Comunitário Especialista se responsabiliza pelas necessidades do doente relacionadas com os medicamentos... mediante a deteção de Problemas Relacionados com Medicamentos para a prevenção e resolução de Resultados Negativos associados à Medicação.” [3]. Tendo isto em mente, é claro que o acompanhamento farmacoterapêutico é uma ferramenta muito importante para a melhoria dos cuidados de saúde de uma sociedade e revela o elevado grau de confiança que o utente tem pelo farmacêutico.

Este tipo de serviço é facilitado pela plataforma Sifarma que nos permite manter registos de utentes fidelizados, como a medicação efetuada ou valores de parâmetros bioquímicos avaliados. O caso 3 apresentado de seguida revela a utilidade desta ferramenta durante um Seguimento farmacoterapêutico.

CASO 3 – Seguimento Farmacoterapêutico

Um utente do sexo masculino, de idade não superior a 65 anos, começou a dirigir-se à FF diariamente para efetuar a medição da tensão arterial, pois queixava-se que, desde que a médica lhe tinha mudado a medicação para a hipertensão, sentia tonturas e cansaço frequentemente. Sendo um utente fidelizado na farmácia, foi possível guardar na sua ficha de utente os valores medidos. O objetivo era, após diversas medições consecutivas, entregar ao utente um registo rigoroso da sua tensão arterial para ele, conseqüentemente, entregar à médica. Com este trabalho de equipa, a médica poderia utilizar o relatório fornecido pela farmácia para averiguar se a medicação prescrita estava a exercer o efeito pretendido ou se precisava de ser alterada.

2.1.8. Educação/Sensibilização para a Saúde

Segundo o artigo 9º, secção I, do código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos (CDOF) o farmacêutico “é um agente de saúde, cumprindo-lhe executar todas as tarefas que ao medicamento concernem, todas as que respeitam às análises clínicas ou análises de outra natureza de idêntico modo suscetíveis de contribuir para a salvaguarda da saúde pública e todas as ações de educação dirigidas à comunidade no âmbito da promoção da saúde.” [1].

A FF distingue-se notavelmente pelo empenho que revela em momentos de educação para a saúde aos seus utentes. Como referi no tópico 2.1.1, a equipa da FF é formada por profissionais dotadas de conhecimento e capacidade de comunicação, o que se traduz numa relação farmacêutico-utente de excelência.

Tendo em conta que o meu estágio decorreu durante a pandemia de COVID-19, muitas foram as recomendações que pude dar nos atendimentos que efetuei, como a correta colocação da máscara e a utilização do álcool a 70º para uma desinfeção correta e eficaz.

De salientar que, para além de toda a sensibilização que a FF efetua diariamente em casos específicos de atendimento, é apologista do kit “Redução de Riscos” do Programa Troca de Seringas, um programa idealizado e criado pela Farmacêutica Odette Ferreira. Considero que a continuação desta ideia é um excelente modo de honrar a sua criadora e valorizar a profissão farmacêutica. Assim, atento que não há maior prova de que a FF exerce o seu dever como agente da saúde pública. A oportunidade de conviver com a realidade da toxicod dependência em Coimbra revelou-se muito enriquecedora e fico grata de ter estagiado numa farmácia que, isenta de qualquer julgamento, prioriza a minimização de riscos e luta para o bem-estar de toda a comunidade.

2.1.9. Cross-Selling e Up-Selling

A farmácia comunitária é uma empresa que, como todas as outras, necessita de lucro. Tendo em conta que o lucro advém do número de vendas, é crucial desenvolver estratégias que aumentem o volume das mesmas, como o *Cross-selling* e o *Up-selling*. De modo sucinto, o *Cross-selling* consiste na oferta de produtos complementares àquele que o utente está disposto a comprar enquanto que o *Up-selling* consiste na substituição do produto que o utente está disposto a pagar por um que, satisfazendo as necessidades do utente, oferece mais lucro à farmácia.

Durante o meu período de estágio fui adquirindo mais confiança no atendimento e tive a oportunidade de efetuar algumas destas estratégias de venda, contudo, devo realçar que, apesar do aumento de lucro da farmácia ser um objetivo, nunca é esquecido que o foco principal é o utente.

CASO 4 – Cross-selling e Up-selling

Uma utente do sexo feminino, acompanhada da filha de 5 anos, dirigiu-se à FF queixando-se que a filha apresentava inúmeras picadas de melgas e solicitou o Fenistil® para o alívio da comichão.

A FF aposta na marca Pranarom®, uma marca que disponibiliza produtos naturais à base de OE. Expliquei à utente que, de facto, tinha na farmácia o produto que me estava a pedir, contudo, apresentei-lhe o gel calmante da Pranarom® referindo as suas vantagens em relação ao Fenistil® como, o facto de ser natural, não fotossensibilizante e conter aloé vera na sua composição que acelera cicatrização. O facto de ser um produto natural e destinar-se ao uso em crianças agradou a utente que acabou por optar por levar o produto que sugeri. De seguida, tendo em conta que a criança era mordida frequentemente, aconselhei que também levasse um repelente, sugestão que foi aceite de bom grado.

CASO 5 – Cross-selling

Uma jovem adulta dirigiu-se à FF com uma receita de antibiótico destinada ao tratamento de uma infeção urinária. Depois de explicar como devia proceder para a toma correta do medicamento e ter indicado que deveria beber bastante água, a utente referiu que já sabia o que tinha de fazer, visto que sofria de infeções urinárias frequentemente. Deste modo, apresentei-lhe o Cistisil®, um produto natural indicado no tratamento do desconforto urinário. Expliquei que, contendo na sua composição arando vermelho que impedia a adesão de bactérias às células do epitélio da bexiga, e diuréticos como a cavalinha e a uva ursina, que

aumentam a diurese, este produto natural era um ótimo aliado na prevenção de futuras infeções urinárias [4]. A jovem acabou por aceitar a sugestão e levou o produto para experimentar, depois de terminar o tratamento com o antibiótico.

2.1.10. Marketing Farmacêutico

Tendo em consideração a crise que afeta o setor farmacêutico atualmente, torna-se fundamental a implementação de uma rigorosa gestão comercial que permita à farmácia manter-se financeiramente sustentável. Este aspeto exige uma gestão minuciosa dos *stocks* mínimos e máximos de cada produto para evitar ruturas de stock ou produtos sem rotatividade e uma análise criteriosa das condições comerciais de compra e venda dos produtos. A adicionar a estes dois processos, também é crucial o acompanhamento contante do mercado de forma a aliar fatores como a “sazonalidade” e a “rotatividade” dos produtos às necessidades dos utentes, de preferência, com a maior rentabilidade para a farmácia assim como com preços acessíveis para o utente.

Dadas as circunstâncias atuais do preço dos medicamentos sujeitos a receita médica em Portugal e as margens cada vez menores da venda dos mesmos, o *marketing* é crucial para aumentar as vendas dos restantes produtos comercializados no canal farmácia, e assim aumentar a sua sustentabilidade. Desde o planeamento de um linear, à renovação frequente da montra, até ao envio de mensagens publicitárias avisando o utente que o produto que costuma comprar está com uma campanha promocional, o *marketing* está sempre presente.

Na FF tive oportunidade de ajudar na realização de algumas campanhas de *marketing* que tiveram por base promoções da marca, a sazonalidade de determinados produtos (protetores solares) e ocasiões especiais como o Dia Internacional da Saúde da Mulher (Anexos 3,4 e 5).

2.2. Fraquezas

2.2.1. Puericultura

A FF está localizada na Baixa de Coimbra e, pelo que constatei durante o meu período de estágio, este local não é muito frequentado por futuras mães, o que se reflete numa reduzida oferta de produtos de puericultura. Tendo isto em mente, considero que tive muito pouco contacto com esta área não tendo oportunidade de desenvolver o meu conhecimento acerca deste tipo de produtos.

Compreendo que, devido ao espaço limitado da FF, a escolha de produtos expostos seja minuciosa e de acordo com o grau de procura dos utentes, contudo, penso que seria uma mais valia ter uma pequena quantidade de certos produtos essenciais da área da puericultura para salvaguardar certas emergências, por exemplo, quando a FF é a farmácia de serviço. Saliento que, no final do meu estágio, a FF estava a desenvolver um cantinho de bebe, pois a equipa já tinha constatado que era uma mais valia ter o essencial desta área para futuras urgências.

2.2.2. Preparação de Manipulados

A preparação de manipulados é considerado um serviço ancestral da atividade farmacêutica. Infelizmente, com a produção em série que se realiza nas indústrias farmacêuticas, as prescrições de medicamentos manipulados sob a forma de Fórmulas Magistrais são cada vez mais escassas, sendo prescritas unicamente em terapêuticas individuais muito específicas.

A FF providencia um espaço adequado para a preparação de manipulados. Contudo, a falta de prescrições de medicamentos manipulados associada ao panorama de pandemia em que nos encontramos atualmente, não me permitiu preparar este tipo de medicamentos, revelando-se um ponto fraco no meu estágio curricular. Considero que seria uma mais valia na minha formação e uma boa oportunidade para colocar em prática alguns conceitos apreendidos durante o meu percurso em MICF.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Formações

Como profissional de saúde, o farmacêutico deve procurar uma permanente atualização técnica e científica, no intuito de acompanhar a constante evolução das ciências da saúde.

Sendo as formações promovidas por entidades externas, como indústrias farmacêuticas e de dermocosmética, tratam-se de oportunidades para uma melhoria contínua que, durante o meu estágio na FF, tive o privilégio de beneficiar. Participei em várias sessões de formação, nas mais diversas áreas de atuação do farmacêutico, entre as quais:

- ❖ *Suplementação nutricional enteral: Ação de formação promovida pela Fresubin® com o tema “Alimentação na Geriatria”;*

- ❖ *Aromaterapia*: Ações de formação promovidas pela Pranarom[®] com os temas “Aromaterapia em tempos de vírus”, “Aromaterapia no equilíbrio do corpo e da mente” e “Perda de peso e controlo de apetite”;
- ❖ *Dermocosmética*: Ação de formação promovida pela Caudalie[®];
- ❖ *Relações Interpessoais*: Ação de formação promovida pela PhAct[®];
- ❖ *Apresentação do novo módulo Sifarma[®]*: Ação de formação promovida pela Academia Glintt[®].

Estas formações revelaram-se uma mais-valia em momentos de aconselhamento ao utente, pois o conhecimento adquirido tornou-me apta a escolher os produtos mais indicados a cada situação nas diferentes áreas abordadas.

Em suma, considero que, para além de uma oportunidade, a procura de formação contínua deve ser considerada uma força da FF, pois a busca constante de progresso é a chave para o sucesso de qualquer equipa.

2.3.2. Implementação do novo programa Sifarma 2020[®]

No final do mês de agosto foi implementado em várias farmácias portuguesas o novo módulo de atendimento do Sifarma[®], incluindo na FF. Tendo dado como terminado o meu estágio curricular apenas a 4 de setembro, tive a oportunidade de efetuar atendimentos nas duas últimas semanas utilizando o novo módulo.

Considero que, sem dúvida, foi uma mais valia no meu percurso de estágio ter contactado com ambos os modelos do Sifarma, pois para além de me tornar apta a trabalhar em qualquer uma das versões, estimulou o espírito de adaptação rápida de toda a equipa à nova ferramenta de trabalho de forma a não prejudicar nenhum atendimento, uma qualidade importante que revela a constante vontade da FF de acompanhar a evolução na área farmacêutica.

2.3.3. Metodologia Kaizen

Atualmente, a qualidade é a principal estratégia competitiva em diversos setores, incluindo o setor farmacêutico. Um serviço de qualidade está ligado a um aumento de produtividade, a melhoria de resultados e inevitavelmente, através da redução de custo e do desperdício, a um aumento de lucro.

Kaizen é uma palavra de origem japonesa, *kai* significa melhoria e *zen* significa contínua e, de forma simples e direta, a metodologia *Kaizen* incentiva o espírito de melhoria contínua. De salientar que é crucial que toda a equipa esteja envolvida e empenhada nesta procura constante de soluções, de forma a corresponder às expectativas e necessidades dos utentes, de forma a obter lucro e a satisfação não só dos utentes, mas também de toda a equipa [5].

O *kaizen* é normalmente descrito como a “filosofia mais poderosa da administração”, na FF tive a oportunidade de observar os efeitos positivos da aplicação desta metodologia. Para além de se tornar uma mais-valia no que toca a diminuição do desperdício tanto a nível de tempo como a nível de recursos, esta metodologia incentiva que, para uma boa gestão, deve ser implementado um sistema de sugestões dinâmico, com o propósito de encontrar boas ideias para a resolução de problemas e estimular o processo de melhoria. Tendo isto em mente, saliento que a equipa FF sempre se mostrou motivada na procura de novas ideias e estas sempre foram ouvidas e ponderadas, o que se refletia num trabalho repleto de empenho e dedicação, tornando-se, desde cedo, um exemplo que pretendo seguir tanto a nível profissional como pessoal.

2.4. Ameaças

2.4.1. Medicamentos esgotados

Durante o meu estágio na FF, alguns medicamentos, nomeadamente benzodiazepinas (Victan[®] e Serenal[®] 50mg), permaneceram esgotados durante um longo período de tempo, o que tornou impossível satisfazer as necessidades terapêuticas dos utentes que dependiam desta medicação. Este tipo de situações, para além de gerar descontentamento, obriga os utentes a suspenderem a terapêutica, o que pode prejudicar a efetividade do tratamento. Para além da situação supracitada, por vezes existiram situações em que o utente queria um medicamento de um laboratório específico e este se encontrava esgotado o que, quando os utentes não compreendiam que era um problema fora do nosso campo de atuação, gerava uma certa desconfiança que poderia gerar conflito e por em causa a fidelização do utente à farmácia. Assim, considero que situações de medicamentos esgotados constituem uma ameaça à atividade farmacêutica.

2.4.2. Pandemia COVID-19

A 4 de maio de 2020 a FFUC permitiu que os seus finalistas retomassem ou, no meu caso, iniciassem o estágio em farmácia comunitária. A “normalidade” foi algo que não houve no nosso período de estágio, fomos obrigados a adotar novas medidas que não existiam anteriormente, e é por isso que, apesar da pandemia ter sido uma ameaça na realização do meu estágio, também foi um desafio enriquecedor.

A segurança, tanto da equipa FF como dos utentes, sempre esteve em primeiro lugar, o plano de desinfeção de 2 em 2 horas, a utilização de máscaras e viseiras e a colocação de acrílicos foram medidas preventivas que as farmácias foram obrigadas a tomar. Porém, estas medidas acrescentaram ainda mais desafios, pois a dificuldade de comunicação, a impaciência de certos utentes e o medo do desconhecido eram notáveis. Se estas situações se revelavam trabalhosas para um farmacêutico experiente, para um estagiário como menos experiência ainda eram mais complexas.

A pandemia permitiu por um lado valorizar a farmácia comunitária como uma extensão do Serviço Nacional de Saúde (SNS) na comunidade e por outro lado demonstrar a capacidade de adaptação dos farmacêuticos. Exemplo disso foi a cedência de medicamentos hospitalares, em parceria com o SNS, para garantir a acessibilidade dos utentes aos medicamentos sem implicar a deslocação a hospitais.

3. CONCLUSÃO

Atualmente, a farmácia comunitária ocupa um papel central na cadeia de cuidados de saúde. Assim, a possibilidade de realizar um estágio curricular no final do nosso percurso académico é uma oportunidade excelente que a FFUC nos proporciona, permitindo que os estudantes vivenciem o quotidiano do farmacêutico comunitário, responsável pela saúde pública e prestador de cuidados de saúde diferenciados, na reta final de 5 anos de estudo repletos de esforço e dedicação.

Estes 4 meses de estágio demonstraram que a comunicação, a relação com o utente e os serviços farmacêuticos como a indicação e o seguimento farmacêutico, são elementos fundamentais na nossa atividade profissional, de forma a promover o uso seguro e eficaz do medicamento, a adesão à terapêutica e, no geral, o bem-estar da sociedade. Para este efeito, é essencial que o farmacêutico comunitário agregue conhecimento de várias áreas do saber farmacêutico e, para isso, é necessário estimular um espírito de melhoria contínua, de forma a responder às necessidades dos utentes sempre com a informação mais atualizada.

O estágio na Farmácia Figueiredo foi um ponto fulcral na minha preparação académica e, sem dúvida, permitiu-me adquirir conhecimentos e competências que me vão auxiliar no futuro, tanto a nível profissional como pessoal. Foram 4 meses repletos de aprendizagem e marcados por uma evolução constante enquanto pessoa e futura profissional de saúde.

Concluindo, só me resta agradecer à equipa da Farmácia Figueiredo por todo o apoio e disponibilidade, por todos os momentos de aprendizagem, por todas as correções e por todas as oportunidades, sem dúvida que serão sempre um pilar da minha formação como farmacêutica. Um enorme e sincero obrigado.

4. BIBLIOGRAFIA

- [1] Ordem dos Farmacêuticos, - “Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos,” pp. 1–9, (1998).
- [2] Direção Geral de Saúde, - “Propostas da Terapêutica - Homeopatia,” (2003).
- [3] Ordem dos Farmacêuticos, - “Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária (BPF),” *Cons. Nac. da Qualidade, 3ª edição*, vol. 3ª Edição, p. 53, (2009).
- [4] A. Em and T. Por. - “Instituto superior de ciência da saúde egas moniz,” (2014).
- [5] L. Fonseca, R. Ribeiro, R. Reis, and K. Mesquita. - “A FERRAMENTA KAIZEN NAS ORGANIZAÇÕES. Área temática: Gestão pela Qualidade Total,” *Xii Congr. Nac. Excel. Em Gestão Iii Inovarse 2016*, p. 22, (2016).

5. ANEXOS

Anexo I | Comunicação

Gavetas Atendimento

A1		
Adalat CR, 30 mg x 28 comp.	Alprazolam Pazolam, 0,5 x 60 comp.	Amlodipina Generis, 10 mg x 60 comp.
Ác. Fólico Generis, 5 mg x 60 comp.	Alprazolam Radiopharm, 0,25 x 60 comp.	Amlodipina Generis, 5 mg x 60 comp.
AAS Pharmakern, 100 mg x 30 comp.	Alprazolam Pazolam, 0,25 mg x 60 comp.	Amlodipina Aurovitas, 5 mg x 60 comp.
AAS Aurovitas 100mg x 30 comp.	Alopurinol Generis, 300 mg x 60 comp.	Alprazolam radiopharm, 1 mg x 60 comp.
Acetilcisteína Azevedos, 600mg x 60 comp. efe	Aerius, 5 mg x 20 comp.	Alprazolam Pazolam, 1 mg x 60 comp.

A2		
Atorvastatina Generis, 10 mg x 56 comp.	Atorvastatina Mylan, 20 mg x 28 comp.	Azitromicina Azevedos, 500 mg x 3 comp.
Atorvastatina Azevedos, 10 mg x 56 comp.	Atorvastatina Generis, 20 mg x 28 comp.	Azitromicina Aurovitas, 500 mg x 3 comp.
Aspirina GR, 100 mg x 30 comp.	Atorvastatina Azevedos, 20 mg x 28 comp.	Avamys (120 doses), 27.5mcg/dose x 1 susp. Pulv.nasal
Amox + Ac. Clav. Aurovitas, 875/125 mg x 16 comp.	Atorvastatina Mylan, 10 mg x 56 comp.	Atorvastatina Azevedos, 40 mg x 28 comp.

Figura I: Esquema de duas gavetas do atendimento.

Anexo 2 | PIM



Figura 2: Exemplo de uma Preparação de Medicação Individualizada.



Figura 3: Campanha publicitária “25% de desconto no 1º produto” e “70% de desconto no 2º produto” da marca Eucerin.



Figura 4: Campanha publicitária de produtos portugueses durante a Pandemia COVID-19.

APOTECA NATURA

LIBIFEME®

A PENSAR NA SAÚDE ÍNTIMA DAS MULHERES

Gama LIBIFEME ... Mais Prazer ... Naturalmente!

www.libifeme.com

Dia Internacional da Saúde da Mulher

Figura 5: Campanha publicitária alusiva ao Dia Internacional da Saúde da Mulher.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA HOSPITALAR

“L’Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna Policlinico S. Orsola-Malpighi”

SANT’ORSOLA



Bologna, Itália

Orientado pela Dra. Alessandra Stancari

LISTA DE ABREVIATURAS

FFUC: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FH: Farmácia Hospitalar

HUB: Hospital Universitario de Bolonha

IDS: *Investigational Drug Service*

MICF: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

NBP: Norme di Buona Preparazione

SWOT: Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades e Ameaças, do Inglês *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. INTRODUÇÃO

Um dos pontos fortes da área de ciências farmacêuticas é a extrema diversidade de vertentes profissionais que engloba, tornando possível a um estudante, futuro trabalhador, um vasto leque de oportunidades de trabalho, tais como a indústria farmacêutica, a farmácia comunitária, a farmácia hospitalar, investigação laboratorial, entre outras. Tendo isto em mente, através de acordos com entidades de diversos setores da área farmacêutica, que visam auxiliar o estudante de MICF na aquisição de conhecimentos práticos essenciais para um futuro profissional de sucesso, a FFUC disponibiliza uma formação diferenciadora e experiência em campo laboral a todos os seus futuros profissionais.

De modo a usufruir desta oportunidade, e atendendo ao meu interesse em Farmácia Hospitalar (FH), suscitado nas cadeiras de farmácia galénica e farmácia hospitalar, candidatei-me a um estágio de dois meses na *L’Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna Policlinico S. Orsola-Malpighi*, em Itália, durante o período de 13 de janeiro a 9 de março de 2020, sob a orientação da Dra. Alessandra Stancari.

O presente relatório de estágio, estruturado sob a forma de análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), visa retratar a minha experiência e adaptação ao ambiente profissional, a aquisição e aplicação de conhecimentos adquiridos durante este período de aprendizagem e todas as adversidades superadas que me possibilitaram um crescimento a nível humano e profissional, tendo em conta uma reflexão crítica e introspetiva.

2. POLICLINICO S.ORSOLA-MALPIGHI

A farmácia hospitalar é responsável por todo o processo em redor da aquisição e controlo do percurso do medicamento, desde a sua preparação e distribuição pelas enfermarias do hospital até ao controlo da informação clínica, científica e financeira associada à avaliação de ensaios clínicos inovadores. Os farmacêuticos hospitalares, devido a todas as tarefas que têm a seu cargo, acabam por desenvolver aptidões e conhecimentos científicos em diversas fases do circuito do medicamento dentro de um hospital, assumindo um elevado nível de trabalho e responsabilidade no que toca à terapia que é administrada a cada paciente.

No Hospital Sant'Orsola a área farmacêutica é dividida em três departamentos principais:

- ❖ Centro Logístico: Responsável pela gestão farmacêutica, coordena e monitoriza a compra de produtos farmacêuticos;
- ❖ Serviço de Ambulatório: Efetua a entrega direta do medicamento ao doente;
- ❖ Farmácia Clínica: considerado o maior departamento farmacêutico do hospital, engloba inúmeros laboratórios, cada um com uma finalidade diferente, por exemplo, preparações estéreis, preparações não estéreis, injetáveis, galénicas e nutrição parenteral e, por fim, o serviço responsável pelos ensaios clínicos nominado de Investigational Drug Service (IDS).

De salientar que o serviço de FH desempenha um papel crucial na medicação tanto de pacientes internados como também de doentes em ambulatório, pois permite a realização de terapias personalizadas para cada individuo a partir da realização de medicamentos manipulados. Este tipo de medicamentos pode ser classificado como *Fórmula Magistral* (preparação de acordo com uma prescrição médica) ou *Preparados Oficiais* (preparação de acordo com as indicações presentes na Farmacopeia). Os medicamentos manipulados no meio hospitalar são muito requisitados, por exemplo, no Serviço de Pediatria, pois devido à falta de rentabilidade, a indústria farmacêutica não produz uma ampla gama de dosagens e formulações e, nesses casos, a FH tem de atuar.

2.1. Laboratório de Galénica

A produção de medicamentos manipulados é parte integrante da atividade de um farmacêutico hospitalar. Neste laboratório são preparados medicamentos não injetáveis convencionais e de validade limitada que se destinam a pacientes internos e externos do hospital. O dia-a-dia de um farmacêutico no laboratório de galénica pode ir desde a elaboração

de um preparado magistral, com dosagem, formulação ou um conjunto de excipientes diferente daquele que se encontra no mercado, à preparação de medicamentos órfãos e experimentais.

Todos os processos durante a elaboração de um manipulado são de acordo com a *Norme di Buona Preparazione (NBP)*, de forma a garantir a obtenção de um produto final seguro e eficaz.

2.2. IDS

O hospital universitário de Bolonha é um dos estabelecimentos que mais se destaca no campo dos ensaios clínicos em Itália. Deste modo, tornou-se essencial criar o IDS, um serviço que visa lidar com as questões burocráticas e controlo dos medicamentos experimentais de cada ensaio clínico efetuado.

Primeiramente, os EC necessitam de ser aprovados pela Comissão Ética e, só depois de autorizada a sua execução, o IDS pode introduzir a informação de cada estudo na sua base de dados, gerando um código específico para cada um de modo a facilitar a identificação do mesmo no sistema informático.

Os medicamentos experimentais são deixados no hospital devidamente acompanhados de documentos de identificação que necessitam de ser minuciosamente verificados pelo farmacêutico responsável. Deve ser controlada a quantidade, o nº de lote, a data de validade e, através de um aparelho de medida da temperatura, as variações de temperatura durante todo o processo de transporte. De seguida, os medicamentos são armazenados numa câmara de refrigeração entre os 2°- 8°C, onde permanecem durante o período de registo no sistema informático.

Depois do medicamento se encontrar devidamente registado, pode seguir dois caminhos diferentes: ser encaminhado diretamente para o departamento onde vai ser administrado, por exemplo hematologia ou oncologia, ou em casos onde o medicamento ainda precisa de ser preparado, por exemplo em situações onde a preparação se encontra no estado sólido e necessita de ser preparada uma infusão, permanece no mesmo departamento. Se o fármaco seguir o segundo cenário, é registado numa segunda base de dados nominada *Log80*, onde lhe é atribuído um código específico. O *Log80* é um programa informático onde se encontra disponível os dados completos do paciente, como a prescrição médica e o esquema terapêutico (dosagem, duração da terapia e via de administração).

Em situações em que o controlo do medicamento experimental revela problemas, por exemplo, falha na manutenção de uma temperatura adequada durante o transporte, o fármaco

é deixado em “quarentena”. Nestes casos, o farmacêutico deve alertar a indústria que forneceu o fármaco e é esta que decide, com os documentos de verificação do farmacêutico responsável pelo controlo, se o fármaco deve ser utilizado no ensaio ou não.

Por fim, em casos em que o paciente não obtém resultados positivos com nenhum tratamento nem ensaio clínico, dá entrada no grupo “*Compassionevoli*”, ou seja, “a última hipótese”, onde são utilizados fármacos que ainda não foram aprovados. Cada fármaco é específico para cada paciente e, por questões de privacidade, apenas se conhecem as iniciais do destinatário.

3. ANÁLISE SWOT



Esquema I: Quadro-resumo da análise SWOT.

3.1. Forças

3.1.1. Preparações galénicas estéreis e não estéreis

A preparação de diferentes preparações galénicas individualizadas e adaptadas a necessidades específicas foi, sem dúvida, um ponto forte do meu estágio em FH. A nível de preparações não estéreis, a farmacêutica responsável concebeu-me total autonomia no preenchimento das folhas de preparação, na manipulação e na rotulagem, verificando e validando apenas no final. Nesta etapa do meu planeamento de estágio tive a oportunidade de aplicar inúmeros conhecimentos laboratoriais obtidos ao longo do meu percurso em MICE. As preparações galénicas estéreis são obrigatoriamente realizadas em salas assépticas adequadas com câmaras de fluxo laminar horizontal, no intuito de proteger o manipulado.

As preparações realizadas com maior frequência eram para uso pediátrico devido à não comercialização de dosagens específicas para crianças.

3.1.2. Ensaio Clínicos

Os ensaios clínicos consistem em estudos realizados no Homem com o intuito de verificar ou descobrir os efeitos de um ou mais medicamentos experimentais.

Durante o meu estágio em FH tive o privilégio de assistir à realidade de um farmacêutico no serviço de ensaios clínicos, desde a reunião com o promotor da indústria que fornece o medicamento experimental, passando pelos processos burocráticos e de controlo do medicamento no momento da receção, culminando na entrega do respetivo ao departamento destinado.

Esta oportunidade foi, sem dúvida, uma mais valia para o meu percurso académico, pois desconhecia as funções exercidas por um farmacêutico na área de ensaios clínicos. Consegui perceber uma realidade que, para mim, era totalmente nova, o que tornou a experiência muito mais enriquecedora e desafiante.

3.2. Fraquezas

3.2.1. Planeamento/Duração do estágio

No meu ponto de vista, um planeamento de estágio bem realizado é essencial para que o estudante tenha a oportunidade de aproveitar igualmente em todos os serviços farmacêuticos do hospital.

Dentro dos três setores que frequentei (Galénica, IDS e Distribuição), a minha passagem pelo departamento de distribuição foi muito breve, pois só era permitido um número específico de estagiários em cada departamento e, devido à falta de coordenação entre os planeamentos de estágio de cada estudante, acabei por permanecer mais tempo no departamento de Farmácia clínica, ou seja, no IDS e no laboratório galénico. Esta fraqueza poderia ter sido ultrapassada se a duração do estágio em FH fosse superior.

A duração do estágio em FH fora de Portugal é, no mínimo, três meses, pois devido a todos os desafios adjacentes a um estágio no estrangeiro, é necessário mais tempo para adquirir e consolidar os conhecimentos nesta etapa académica. Apesar de se terem tratado de três meses bastante produtivos, considero que três meses continua a ser insuficiente, pois para a nossa formação enquanto futuros farmacêuticos, seria necessário dispensar mais tempo em diversas áreas da FH, como na preparação de manipulados e nos ensaios clínicos. Desta forma, considero que a duração do estágio se revelou um ponto fraco no meu estágio curricular, pois necessitava de acompanhar a equipa farmacêutica deste hospital durante um período maior, de forma a adquirir mais conhecimento e autonomia na realização de tarefas.

3.2.2. Barreira Linguística

Um dos principais pontos fracos do meu estágio foi, claramente, a barreira linguística, que é inevitável quando se efetua um estágio fora de Portugal. Apesar da língua portuguesa e italiana derivarem ambas do latim, o que as torna semelhantes, por vezes era complicado compreender totalmente o que me era dito. Claro que quando existia alguma dúvida que necessitava de expor, ou algum farmacêutico me queria prestar algum esclarecimento, havia sempre a possibilidade de recorrer à língua inglesa, porém em Itália nem todos os profissionais são fluentes nesta língua.

Sendo a comunicação uma dificuldade, sinto que o processo de aprendizagem teria sido facilitado e melhor aproveitado se a articulação entre mim e os farmacêuticos não fosse tão complicada.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Formação contínua

Durante o meu estágio foram várias as oportunidades que me proporcionaram para adquirir novos conhecimentos. Sendo o Hospital Universitário um estabelecimento de referência em Itália ao nível de ensaios clínicos, são vários os promotores de medicamentos experimentais que se dirigem ao IDS para apresentar os seus novos projetos. Todos os estagiários interessados no assunto eram autorizados a assistir às apresentações e a colocar questões, o que me permitiu amplificar o meu saber relativamente a esta área farmacêutica um pouco desconhecida. No Serviço de Galénica, com o apoio da Faculdade de Farmácia de Bolonha, assisti a uma palestra relativamente à nutrição parentérica, o que me permitiu obter novas informação científica relativamente a este tema tão importante no ramo da FH.

Todas estas oportunidades que me surgiram durante estes dois meses, juntamente com todo o conhecimento que me foi transmitido pelos profissionais de saúde que me acompanharam, tornaram este estágio uma experiência verdadeiramente enriquecedora e motivante. De facto, tendo em conta a constante evolução do mundo da ciência e o papel crucial que o farmacêutico desempenha neste meio, torna claro que este profissional de saúde tem de procurar continuamente a atualização dos seus conhecimentos científicos. De forma a acompanhar todos os avanços científicos da área da saúde e tecnologia o farmacêutico deve apostar numa formação contínua, pois só um saber fortificado e atualizado permite a concretização de todas as funções que competem ao farmacêutico com exímia qualidade e o exercício desta tão exigente profissão que trabalha sempre focado no doente.

3.4. Ameaças

3.4.1. Pandemia COVID-19

Foi durante o meu estágio em FH que a pandemia COVID-19 começou a dar os primeiros sinais. O que começou por ser uma experiência de excelência rapidamente se transformou num pesadelo, pois para além do estágio ter sido cancelado, tive de abandonar o país mais cedo que o previsto devido ao cancelamento de voos. Aprendi muito durante o tempo que me foi permitido, contudo, muito ficou por ensinar, assim, considero que a pandemia foi uma das maiores ameaças ao meu estágio curricular, tanto no estágio em farmácia comunitária como em farmácia hospitalar.

3.4.2. Distanciamento do doente

Na maioria dos hospitais o farmacêutico hospitalar, não contactando diretamente com o doente, apresenta uma visibilidade nula que não se adequa à participação indispensável que o mesmo tem no tratamento de um paciente. O único lugar onde o utente tem contacto direto com o farmacêutico hospitalar é na cedência de medicamentos em ambulatório, o que não é de todo suficiente.

O farmacêutico hospitalar, como membro da equipa de profissionais de saúde responsável pelo tratamento de doentes, deve participar nas visitas médicas e no aconselhamento no momento da alta, de modo a ter a oportunidade de esclarecer dúvidas e incentivar a adesão à medicação. Nestas situações o farmacêutico é uma mais-valia, pois pode providenciar um melhor acompanhamento e esclarecimento de questões em relação ao regime terapêutico implementado ajudando o doente a executar o tratamento de forma correta e consciente tanto no hospital como em casa.

4. CONCLUSÃO

Apesar de curto, o meu período de estágio no Hospital Universitário de Bolonha (HUB), permitiu-me conhecer uma área farmacêutica que me era desconhecida até à data. Tive a oportunidade de contactar com diversos profissionais sempre disponíveis a esclarecer qualquer dúvida que surgisse ainda me auxiliaram e motivaram de forma constante no desenvolvimento de novos conhecimentos, aptidões de trabalho e espírito crítico. Considero que, apesar de todos os percalços associados a este culminar do meu percurso académico, a colaboração, o empenho e a disponibilidade da equipa de farmacêuticos do HUB foi, sem dúvida, uma mais valia para que eu pudesse entender o conceito e o trabalho diário de um farmacêutico, e a complexidade, importância e responsabilidade que marca esta profissão.

Este estágio revelou-se uma experiência muito positiva, tanto a nível profissional como pessoal, repleto de pontos positivos e oportunidades que sobrepõem qualquer ponto fraco. Foi patente o meu crescimento, principalmente, a nível pessoal, a vontade constante de adquirir novos conhecimentos e o desenvolvimento de um rigoroso método de trabalho são qualidades que obtive e pretendo aplicar em todos os desafios profissionais e pessoais que aparecerem.

Pessoalmente, continuo a ser da opinião que o farmacêutico hospitalar ainda não tem o reconhecimento merecido, e que seja equivalente à importância das funções que exerce, junto do doente. Assim, considero que esta área devia ser potenciada, e o farmacêutico devia mostrar o seu papel mais ativamente na saúde e bem-estar do doente.

MONOGRAFIA

“The effect of glutamate in cases of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in the newborn: New Therapies”

Orientado pelo Professor Doutor Alcino Leitão

Index of figures

Figure 1. Representation of the main development steps of the brain from conception to adulthood.....	49
Figure 2. Pathophysiological mechanisms in the neonate brain after a HI event.	52
Figure 3. Representation of the glutamate/glutamine cycle.....	55
Figure 4. Evaluation of an acute ischemia with three different imaging techniques: DWI, T2 and ADC.....	57
Figure 5. MRS of a neonate revealing HIE.....	58
Figure 6. aEEG image of a premature infant with HE.....	60
Figure 7. aEEG image of a premature infant without HE.....	59
Figure 8. Classification of the three main classes of neurosteroids in the brain based on their structure.	64
Figure 9. Structure of (A) pregnanolone sulfate and (B) pregnenolone sulfate.....	65

Index of tables

Table 1. Overview of the regions and cell types that express the five Glut transporters.....	54
----------------------------------------------------------------------------------------------	----

Abbreviations

ADC: Apparent diffusion coefficient

aEEG: Amplitude- integrated electroencephalography

AMPA: α -amino-3-hidroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

ATP: Adenosine Triphosphate

BBB: Blood-Brain Barrier

Ca²⁺: Calcium

CBD: Cannabidiol

Cho: Choline

CNS: Central Nervous System

CP: Cerebral Palsy

DHEAS: Dehydroepiandrosterone sulfate

DWI: Diffusion-weighted imaging

Glut: Glutamate

H₂O: Water

HI: Hypoxic-Ischemia

HIE: Hypoxic-Ischemic encephalopathy

Lac: Lactate

MgSO₄: Magnesium Sulfate

MRI: Magnetic Resonance Imaging

MRS: Magnetic Resonance Spectroscopy

Na⁺/K⁺: Sodium/Potassium

NAA: N-acetyl aspartate

NE: Neonatal Encephalopathy

NICU: Neonate Intensive Care Unit

NMDA: N-methyl-D-aspartate

NO: Nitric Oxide

PS: Pregnenolone Sulfate

ROS: Reactive Oxygen Species

TSPO: Translocator Protein

Xe: Xenon

Resumo

A encefalopatia hipoxico-isquêmica é uma das principais causas de mortalidade e morbidade no recém-nascido.

Atualmente, a única terapia realizada em meio hospitalar nesta situação é a hipotermia induzida que, apesar de mostrar resultados positivos, não é 100% eficaz, havendo crianças que permanecem com sequelas para o resto da vida.

Nos últimos 20 anos, com o estudo dos mecanismos associados a esta patologia e o avanço de novas tecnologias de imagem, tornou-se possível a investigação de novas terapêuticas.

Um dos mecanismos desencadeados por um episódio hipoxico-isquêmico é a estimulação exacerbada do neurotransmissor excitatório mais abundante no cérebro mamífero, o Glutamato.

Neste trabalho o autor descreve as diferentes fases que decorrem durante um episódio de hipoxia-isquêmica no recém-nascido, os diferentes meios de diagnóstico mais apropriados para detetar de forma precoce de modo a prevenir danos permanentes e, por fim, terapias inovadoras ainda em fase de investigação contra a ativação exacerbada do recetor NMDA, acontecimento que marca o início da patologia.

Palavras-chave: Encefalopatia Hipoxico-Isquêmica, NMDA, Excitotoxicidade, Glutamato, Novas terapias.

Abstract

Hypoxic-Ischemic encephalopathy (HIE) is one of the main causes of morbidity and mortality in the newborn.

Nowadays, the only therapy available is moderate which, although it may show positive outcomes, it is not 100% effective, and in some cases, children remain with permanent sequelae for the rest of their lives.

In the last 20 years, with the continuous study of the pathways underlying this pathology and the advance of new imaging technologies, it became possible the investigation of new therapies.

One of the pathways triggered by a hypoxic-ischemic episode is the excessive production of the most abundant excitatory neurotransmitter in the mammalian brain, Glutamate.

In this dissertation the author describes the different phases of a hypoxic ischemic insult in a newborn, the three main diagnosis processes that detect earlier in order to prevent permanent neurological disabilities and lastly, new therapies still in development against the overactivation of the NMDA receptor, the main trigger that marks the beginning of the pathology.

Keywords: Hypoxic-Ischemic Encephalopathy, NMDA, Excitotoxicity, Glutamate, New therapies.

I. Introduction

Hypoxic-Ischemic encephalopathy (HIE) is the leading cause of morbidity and mortality in the newborn. It is estimated that about 2-3 infants per 1000 births in developed countries suffer from HIE and in developing countries the rate is 10 times higher, due to limited access to newborn and maternal health care. Of those newborns affected, 15-20% die in the prenatal period, and about 25% of the survivors have to live with permanent neurologic deficits and multiple disabilities, which may limit the independence and diminish the quality of life [1].

Glutamate (Glut) is the most abundant excitatory neurotransmitter in the mammalian brain, and it plays a critical role in learning and memory formation. Glut excitotoxicity is considered the main mechanism in preterm brain injury, the extracellular accumulation of this neurotransmitter damages the immature oligodendrocytes and neurons that are extremely vulnerable in this development period. This build-up of extracellular Glut results in an overstimulation of NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor that leads to a massive Ca^{2+} influx in neuronal cells, triggers the production of reactive species and culminates in a cell death cycle [2].

In this regard, Glut excitotoxicity pathway leads to the typical patterns of brain injury situated in the periventricular white matter. With the development of neuroimaging techniques over the years, it is possible to observe these characteristic lesions, the multiple metabolic changes that follow HIE as well as the effects of potential treatments with non-invasive methods, including Magnetic Resonance Imaging (MRI), Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) and Amplitude- integrated electroencephalography (aEEG) [3] [4].

Nowadays, moderate hypothermia is the only treatment available to delay brain damage in perinatal asphyxia cases. Although it may reduce the adverse outcomes, it is not 100% effective [5].

HIE needs to be a top global health priority, and it is crucial the exploration of new potentials targets and neuroprotective strategies based on the ideal therapeutic window in this complex bio-chemical cascade, in order to reduce the mortality and the possibility of long term cognitive and behavioral impairment [6].

2. Fetal Brain Injury

Intrapartum-related events at full term of pregnancy, including HI, are the third leading cause of childhood death worldwide. These insults result in over 0.7 million newborn deaths and approximately 1.15 million cases of development disorders, commonly known as neonatal encephalopathy (NE) [7].

NE is a term used to describe a neurological disfunction in the newborn infant, it is manifested by symptoms including a subnormal level of consciousness, seizures, difficulty in maintaining respiration, poor feeding and depression of tone and reflexes [8].

The clinical signs of NE intensify after a latent period that can last hours or even days. This evolution is thought to be the reflection of the cascade of neurochemical events that can happen during the brain injury [9].

Since NE is the second most preventable cause of childhood neuro impairment worldwide, with deeply economic, psychologic and social consequences for the families affected, it is a global health priority to protect the newborn brain around the time of birth [7].

3. Brain Development

During the peak time of preterm brain injury (23-32 weeks) the brain undergoes an extremely active development phase. The myelination of axons is one of mature oligodendrocytes' responsibilities and is the key for the development of the white matter, an area of the central nervous system (CNS) mainly responsible for the learning function. Around the peak time of premature brain injury, most of the oligodendrocytes are still immature, which makes the preterm brain more vulnerable to adverse situations [10].

The immature brain has a limited ability to synthesize the appropriate amount of growth factors needed for brain development and self-protection and, when is earlier exposed to inflammation during fetal development, promotes an excessive and unsustainable inflammatory response, due to his immature immune system. Usually the inflammation remains for prolonged periods throughout postnatal life, during the important phases of myelination and brain plasticity [11].

In the Figure 1 it is possible to visualize the main processes that the fetal brain goes through during his maturation from the conception until the adulthood.

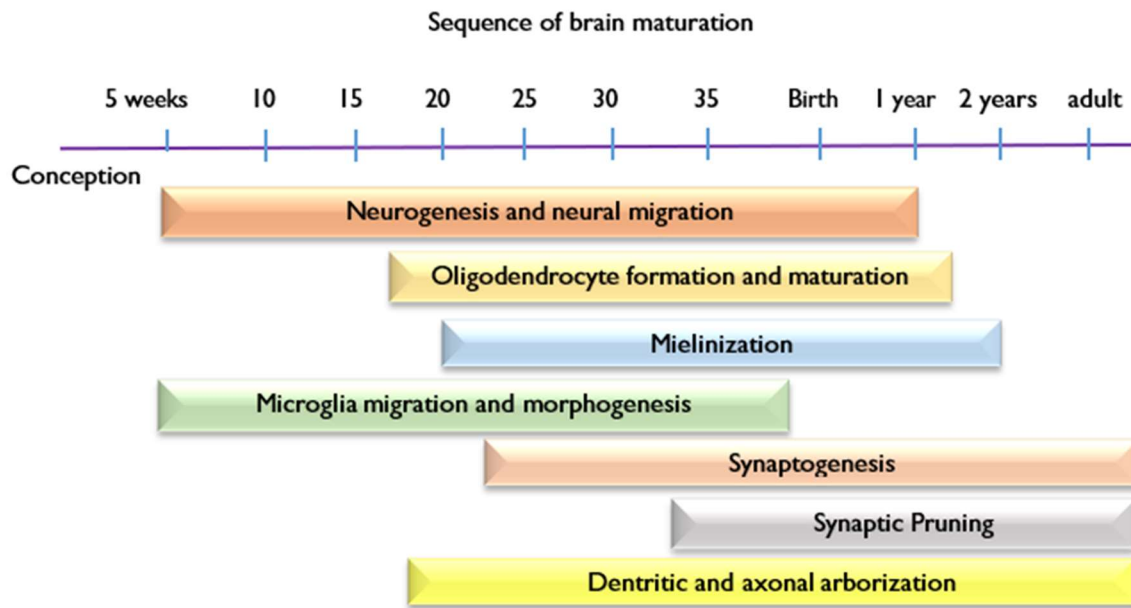


Figure 1. Representation of the main development steps of the brain from conception to adulthood. Adapted from [23]

4. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy

The fetal brain requires an efficient supply of blood, oxygen and energy, in order to maintain the homeostasis and be able to meet cellular energy demands. Despite its capacity to reserve energy when needed, the fetal brain becomes more vulnerable to injury in cases of critical depletion of adenosine triphosphate (ATP). This critical ATP depletion can be caused by two potential triggers of injury, HI originated from several conditions (i.e. prolapse of the umbilical cord, placental abruption and uterine rupture), and inflammation/infection [12].

These events in the immature and developing brain can cause death or result in significant neurological disorders such as cerebral palsy (CP), seizures disorders, epilepsy, development delay, learning disabilities, and behavioral, cognitive and motor abnormalities [13].

4.1. Pathophysiology

The terms “hypoxia” and “ischemia” are often combined because each element may result in the other. The binding term “hypoxic-ischemic encephalopathy” is used to describe a group of molecular, cellular and physiological changes resulting from a low content of oxygen in the blood that decreases the fetal cardiac output, which leads to a reduction of the cerebral blood flow during neonatal period. The ischemia can be partial or complete in terms of extent and can be focal or global in distribution [14] [15].

HIE is not a single event, is an ongoing process that sets in motion a cascading reaction process, where apoptosis or necrosis of nerve cells is the ultimate outcome of brain injury. This pathology can be divided in four distinct phases: acute, latent, secondary and tertiary phases [16].

The clinical signs of HIE evolve, after a latent period, from hours to days. This evaluation time may reflect the energy levels in the brain and the cascade of neurochemical processes responsible for brain damage [7].

4.2. HIE phases

4.2.1. Acute Phase

Under normal conditions, the systemic blood pressure of the fetus keeps the homeostasis and the cerebral blood flow regulated. A critical situation that leads to an insufficient blood supply to the placenta triggers a variety of changes that follow HI, such as the reduction of myocardial contractility and arterial blood pressure, decrease of cerebral blood flow and acidosis in tissues and organs [8].

The acute phase occurs 0-6 hours after the HI injury and marks the first energy failure and the severity of which will depend on the magnitude and duration of the HI episode. When cerebral blood flow decreases it compromises the delivery of extremely important substrates such as glucose and oxygen, that reduction obligates the brain to perform an anaerobic metabolism. Without oxygen, glucose suffers an anaerobic fermentation intensification which results in the depletion of ATP and the increase of lactic acid inside the nerve cells. This decrease leads to a severe energy storage reduction that causes a Na^+/K^+ ATP-dependent pump dysfunction that results in a reduction of ion transport and an intracellular accumulation of Na^+ , Ca^{2+} and H_2O . With the intracellular buildup the membrane depolarizes and begins an uncontrolled release of Glut in the synaptic cleft, which overly activates the NMDA receptor that leads to a Ca^{2+} influx into neuronal and microglial cells and astrocytes [1] [7].

The Ca^{2+} influx triggers many neurotoxic pathways including the creation of an osmotic gradient that results in edema and destruction of cells and activation of nitric oxide synthase, which generates extensive levels of Reactive Oxygen Species (ROS) and nitric oxide (NO). At high concentrations these species ultimately damage the mitochondria via nitrosylation and peroxidation of membrane lipids. Due to the high levels of these reactive species and the lack of endogenous antioxidants such as glutathione, the membrane depolarizes and the

mitochondria starts to fail. In addition, the cytosolic phospholipases are activated, resulting in an increased release of eicosanoid, which leads to inflammation [7] [8].

This ischemic cascade continues with oxidative metabolism failure, acidosis, cytotoxic edema and accumulation of excitotoxins, culminating in cell death via necrosis and apoptotic cascades [17].

4.2.2. Latent Phase

After the primary energy failure, depending on the degree of medical performance and the timing of injury, it occurs a cerebral circulation restoration that may last around 30-60 minutes. This partial recovery determines the latent phase and it is characterized by a recuperation of the cerebral oxidative metabolism [7].

Due to this increase of reoxygenation and reperfusion, the possibility of the neurotoxic cascade being inhibited during this phase has caught many attentions, thereby this phase is now considered a highly important therapeutic window for future neuroprotective therapies.

The latent phase is followed by a second energy failure that can last hours to days [6].

4.2.3. Secondary Phase

Approximately 6-15 hours after the beginning of the HI event, occurs a deterioration of the oxidative metabolism once more, this stage is known as the secondary energy failure. The brain damage continues to grow as the free radicals and excitatory neurotransmitters continue to be released, mitochondrial dysfunction aggravates as well as the energy storage continues to decrease. As this phase progresses, the cascade reaction is activated, and nerve cells death begins [8] [18].

In addition, this secondary phase has a strong connection with the beginning of seizures, due to the inflammatory factors and the severity of the brain injury. Accumulation of excitotoxins, renewed cytotoxic edema and impaired cerebral oxidative metabolism are other events that characterize this period. In this stage the near failure of mitochondrial activity is the key step that leads to neuronal cell death [8] [9] [12].

The risk of mortality and development of neurological deficits is correlated with the severity of the secondary energy failure [8].

4.2.4. Tertiary Phase

The final phase occurs around 72 hours after the neonatal HIE and these pathological processes may continue active for weeks, months and years after the HI insult. According with the severity of the disease, the duration of the critical insult, and the effects of previous therapeutic procedures, there are two possible outcomes: full recovery, where the injured brain tissue starts a repair process, and the glial cells and neurons that survived go through a variety of steps, such as differentiation, proliferation and regeneration; or the damaging continues to get worse [9] [18].

In those infants with hostile neurodevelopmental outcomes, it is possible to observe a persisting cerebral lactic alkalosis, increasing inflammation, which makes the injured brain tissues lose the support of neurotrophic factors and epigenetic changes over the first year of birth.

The survival astrocytes and microglial cells continue to release harmful cytokines, which leads to late cell death and axonal injury, culminating in an aggravation of the pathology [7].

To sum up, HIE pathophysiology can be defined by a correlation of five key events: Oxidative Stress, Intracellular Ca^{2+} influx, Mitochondrial failure, Excitotoxicity and Inflammation [17].

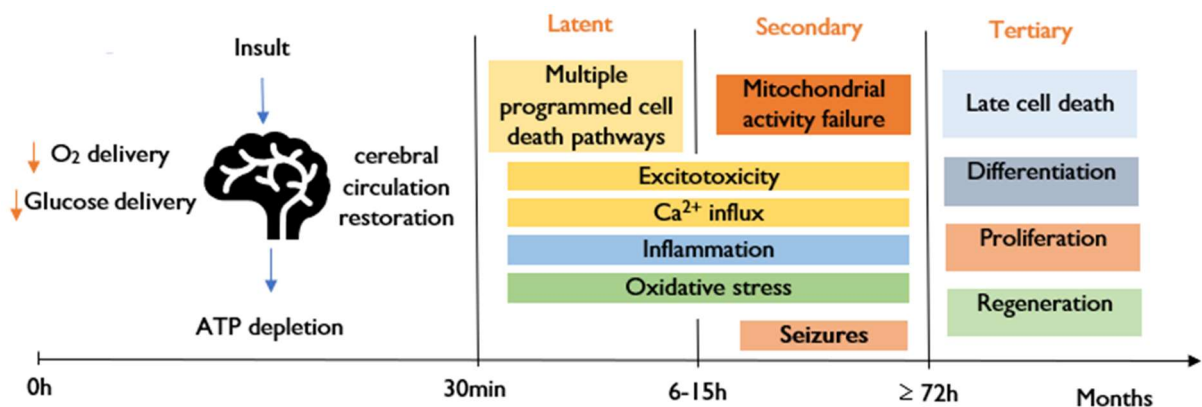


Figure 2. Pathophysiological mechanisms in the neonate brain after a HI event. Adapted from [12].

5. Glutamate

5.1. Glutamate as a neurotransmitter

Out of the scientific community, glutamate is commonly known as “monosodium glutamate” which is the glutamic acid respective sodium salt. This white crystalline solid is usually used as a food additive (E620) or a taste enhancer, however, it is not the motive for the massive scientific interest in glutamate [19].

Glut is the most abundant amino acid in the human brain and it is considered an essential neuromodulator of the CNS, which makes it a main subject in ongoing worldwide researches. Beside acting as the main excitatory neurotransmitter in the brain, mediating the physiological excitatory synaptic transmission, it also plays a critical role in learning and memory formation and other cognitive functions [2].

The receptors of this neurotransmitter can be divided in two types: Ionotropic and Metabotropic. Ionotropic receptors are ligand-gated ion channels and can be subclassified into AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid), NMDA (N-methyl-D-aspartate) or kainate receptors. NMDA and AMPA receptors directly mediate the fast-excitatory action of the neurotransmitter by allowing the influx of Ca^{2+} , and other ions, into cells. Meanwhile the kainate receptors function by allowing Na^+ and K^+ to pass through the cell membrane. Whereas the metabotropic receptors are slowly activated through the activation of G-proteins and an ensuing variety of pathways, serving a primarily modulatory role [20].

Similar to other signaling elements, the signaling outcome is not due to the chemical nature of this neurotransmitter, but in what way cells are set to respond when exposed to Glut. The neurotransmitter function is exerted from the extracellular fluid, since glutamate receptor proteins are expressed on the surface of the cells, being activated from the exterior. Therefore, in aim to control the receptors activation the Glut released in the extracellular fluid needs to be removed and stored intracellularly. Due to the non-existence of extracellular enzymes capable of destroying Glut, it is required a cellular reuptake from synaptic junctions after neuron excitation, which is catalyzed by a group of glutamate sodium dependent transporters (also called EAATs) located in the surface of astrocytes and neurons. These transporters bind and sequester the neurotransmitter in order to process and recycle it [2] [10].

When the extracellular concentration exceeds the limit point, Na^+ dependent active transporters located on the antiluminal surface of brain capillary endothelial cells transfer the

glutamate. The neurotransmitter starts to accumulate inside the capillary cells and, when the concentration surpasses plasma levels, Glut is moved into the blood stream via facilitated diffusion. Glutamate is converted to glutamine, a process named glutamate-glutamine cycle, via glutamine synthetase and, lastly, glutamine returns to the pre-synaptic neuron, where it is converted to glutamate once more, via glutaminase (Figure 3). This cycle is not crucial for a normal supply of glutamate for neuronal release but it is important for a normal glutamatergic transmission [10].

From the different regions and cells types where Glut transporters are expressed, they can be divided into the five subtypes presented in the Table below [21].

Table 1. Overview of the regions and cell types that express the five Glut transporters. Adapted from (Vandenberg & Ryan, 2013).

EAAT subtypes	Type of cell	Region
EAAT1 (GLAST)	Astrocytes	Cerebellum; Inner ear; Retina; Bergman glia; Circumventricular organs; Placenta.
EAAT2 (GLT-1)	Astrocytes; Hippocampus' presynaptic neuronal terminals	Forebrain
EAAT3	Neurons	Hippocampus; Cerebellum; Basal ganglia.
EAAT4	Purkinje cells	Cerebellum
EAAT5	Cone and rod photoreceptor terminals; Axon terminals of rod bipolar cells.	Retina

Since Glut is the main mediator of excitatory signals in the CNS, both too little and too much of it can be harmful, that is why it is crucial that this neuromodulator remains at the right concentrations in the right places at the right time [2].

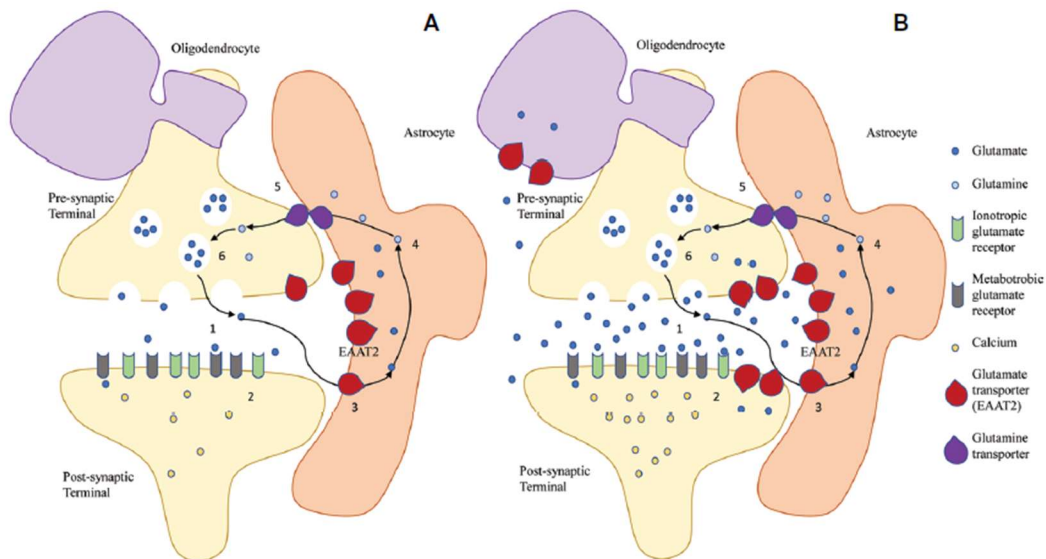


Figure 3. Representation of the glutamate/glutamine cycle during (A) Physiological conditions and (B) excitotoxic conditions in the immature brain.

In (A) glutamate is released to the synaptic cleft (1), binds to post synaptic ionotropic and metabotropic glutamate receptors, inducing Ca^{2+} influx (2), is caught by a EAAT transporter (3) and then is converted to glutamine (4) and return to the pre-synaptic neuron where is converted back to glutamate (5). In (B) the astroglial uptake is not sufficient due to the increased release of glutamate in the synaptic fend, which leads to a sudden rise of extracellular glutamate levels, leading to an overactivation of the receptors, Ca^{2+} overload and, consequently, initiation of apoptotic pathways. Adapted from [10].

5.2. Glutamate excitotoxicity

Excitotoxicity is induced when glutamate homeostatic balance is disturbed with an excessive release and accumulation of the neurotransmitter in the extracellular fluid. This disruption is implicated in both acute CNS injury including hypoxic-ischemia, as well as in chronic neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease [22].

During a CNS injury event, the depletion of ATP triggers a membrane depolarization, which results in a continues release of glutamate, while inhibiting the reuptake of the neurotransmitter due to the lack of energy. Without the correct regulating mechanisms, the massive release of the neurotransmitter leads to a buildup of glutamate within seconds in the extracellular fluid, which will activate a sequence of downstream mediators that will ultimately potentiate neuro toxicity [2] [20].

The main receptor involved in the glutamate-mediated injury is the NMDA receptor, a tri-subunit receptor crucial to neuronal plasticity. The accumulation of glutamate in the synaptic fend leads to an overstimulation of the NMDA receptor, causing an influx of Ca^{2+} ions. The abnormal influx of calcium activates a variety of mechanisms, including activation of proteases, NO synthase, production of free radicals, and mitochondrial toxicity. Ultimately, this cascade of reactions culminates with the stimulation of proapoptotic cellular pathways [20].

6. Methods of evaluation

HIE in preterm infants is the cerebral injury with the highest rate of poor prognosis, thus is deemed as the main cause of mortality and neurodevelopment deficits in infants. Currently, the latest therapeutic methods for this condition are recommended to be conducted as soon as possible, because to provide evidence for an earlier treatment it is required an early diagnosis and prognostic prediction. However, in the past, the early diagnosis of HIE in preterm infants was mainly dependent on previous onset, clinical manifestations and MRI images, which delayed the diagnosis resulting in missing the optimal therapeutic window. A variety of studies conducted all over the world have brought to a conclusion that it is difficult to reach a prognosis and take actions for neurological protection based on these early diagnostic techniques, as well as the potential severity of the condition, because the optimal therapeutic range of HIE in preterm infants is around 6 hours [3] [23].

It is of extreme importance the discovery of more effective, convenient and sensitive outcome measures to enhance the early diagnosis of HIE in preterm infants [23].

6.1. Magnetic Resonance Imaging (MRI)

Progressions in MRI techniques have improved the opportunity to evaluate with more detail the timing, severity and extension of the injury [10].

MRI is a technique widely used that is able to provide detailed information about the soft tissues of the developing brain in utero and in the early postnatal period. It is useful to evaluate brain injury patterns, cerebral malformations and to provide prognostic information, including in cases associated with HIE and preterm birth [24].

The consistent evaluation of patients that suffer from brain injury with MRI technique is extremely important, due to the fact that the brain damage is continuously evolving over time or can even take a few days to become fully apparent. An early evaluation provides more sensitive results, while a later evaluation is considered more specific [23].

In cerebral injury after a HI insult is easier to visualize on conventional T1 and T2 echo sequences during the first and second week of life. The first MRI intervention is only performed 5-7 day after birth, due to the typically unstable cardiorespiratory status of the newborn, which makes the transport from the Neonate Intensive Care Unit to the MRI challenging. MRI evaluation is considered a robust neurodevelopmental outcomes predictor [25].

In moderate to severe HIE there are two main patterns that can be seen in the MRI (Figure 4). Firstly, in 25-75% of cases is possible to visualize a deep nuclear gray matter injury, which is often associated with more severe neurodevelopment disabilities and a higher risk of long-term motor impairment. Secondly, in 15-45% of cases there is a watershed injury, which is mainly correlated with cognitive impairments and less motor deficits [23] [25].

The integration of MRI techniques in clinical practices provides an opportunity of parental counseling in poor outcome situations, including death and long-term devastating disabilities [26].

Although conventional MRI is extremely important to identify and characterize the exact location, severity and extent of the brain injury, it does not identify metabolic perturbations. Therefore, is useful to combine MRI with newer imaging techniques in order to provide the opportunity of an earlier diagnosis and timely interventions [27].

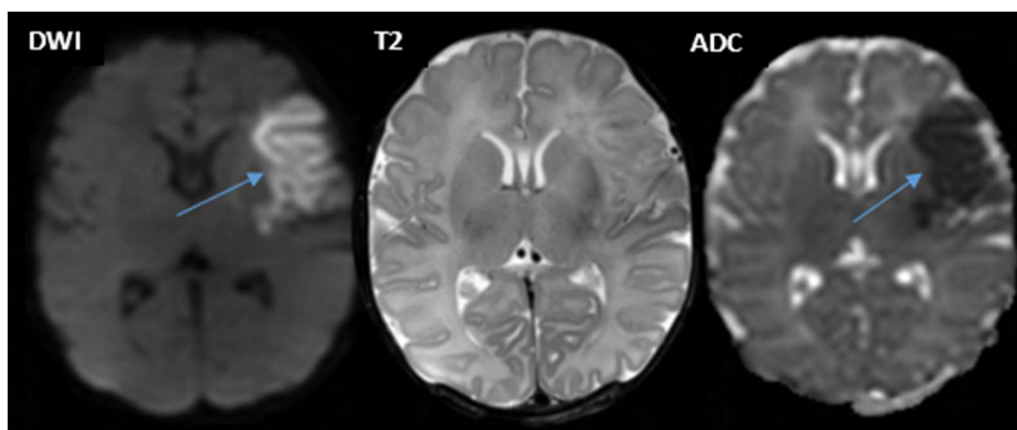


Figure 4. Evaluation of an acute ischemia with three different imaging techniques: DWI, T2 and ADC. In T2 is not easily visible the acute ischemia, however, on DWI and ADC techniques, the injury can be easily identified. Adapted from [29].

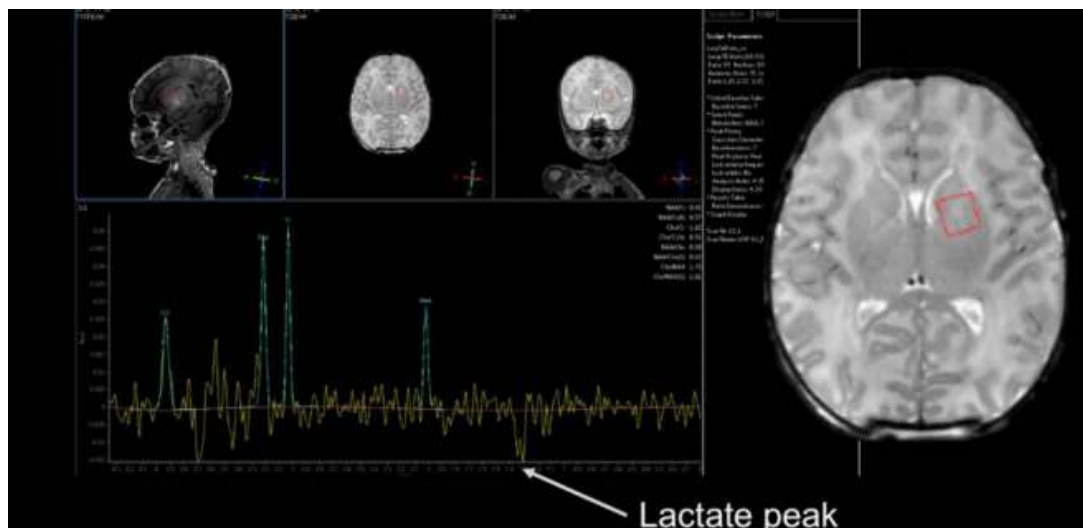
6.2. Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS)

Each compound has its unique spectra, which makes MRS the most common method to observe the composition and structure of cerebral metabolites. This technique takes advantage of the magnetic properties of the nuclei of each metabolite in the cerebral sample when this is put in contact with an external magnetic field. Consequently, with the exposure to radio waves, the nuclei resonate and oscillates originating a signal that can be recorded. The chemical composition and structure of the metabolites in the sample determines the frequency distribution of the signal emitted, which is converted to a spectrum where each peak represents a metabolite present in the sample. The three main metabolites measured are Lactate (Lac), N-acetyl aspartate (NAA) and Choline (Cho) [28].

Clinically, MRS is performed at 1.5-3T, but this field strength is associated with a poor signal to noise ratio (SNR) that, unfortunately, restricts the sensing of cerebral metabolites at minor concentrations. This problematic could be improved or with the performance of more scans, however it would require longer periods of imaging acquisition, which is not achievable with a preterm patient, or increasing the voxel volume used to measure the signal, but this alternative would reduce the resolution of the spectra [28].

During and after the HI event, there are numerous of metabolic pathways that are dysregulated, these modifications render the MRS technique an excellent non-invasive method to provide information about the biochemical status of the brain tissue in preterm infants with HIE. In addition, MRS can be used to provide biomarkers with prognostic worth for later evaluation of neurodevelopmental outcomes and to recognize the preterm infants, that suffered from HI, that could benefit from early treatment [29].

Due to the large amounts of water in the neonatal brain, which increases even more after an HI event, and all the challenges associated with MRS in vivo, only metabolic ratios like Lac/NAA or Cho/NAA (Figure 5) are often used [29].



6.3. Amplitude- integrated electroencephalography (aEEG)

aEEG is an important electroencephalogram monitoring technique that reflects the EEG background activity and is used to evaluate the status of brain function according to electrical activity. This technique is more sensitive, convenient, and easier to monitor than MRI and other imaging procedures, because the results are less influenced by the environmental factors, the graphics given are more intuitive, and is particularly adequate for continues intensive care unit monitoring of preterm infants with HIE. Due to the early presence of abnormal EEG background activity of preterm infants with HIE (Figure 6), when compared to clinical symptoms, signs and related manifestations of imaging, aEEG is considered the best technique to be used in point-of-care intensive care of premature infants with HIE [4].

Studies revealed that preterm infants with normal aEEG amplitude (Figure 7) have higher chances of survival and normal levels of intelligence, while the ones with abnormal aEEG amplitude were more susceptible to suffer from mental retardation and death. In the most severe cases of preterm infants with HI the aEEG background activity monitorization revealed an epileptic-like-activity. Secondly, it is possible to evaluate the sleep-wake cycle of the newborn with this imaging technique and it is demonstrated that an immature sleep-wake cycle is a crucial indicator of a poor neurological prognosis [4].

In conclusion, premature infants that suffer from HIE have specific aEEG characteristics that can be used to anticipate the prognosis and severity of HIE.

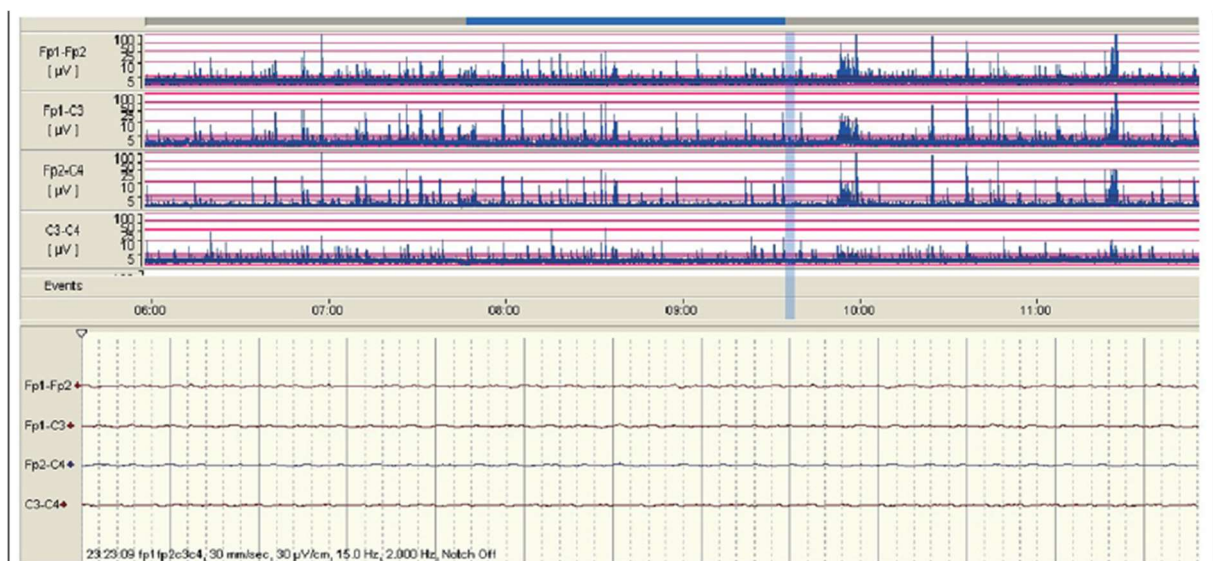


Figure 6. aEEG image of a premature infant with HE: it is visible a severe abnormality in the background activity. The evaluation shows a complete flat tracing background pattern. Adapted from [4].

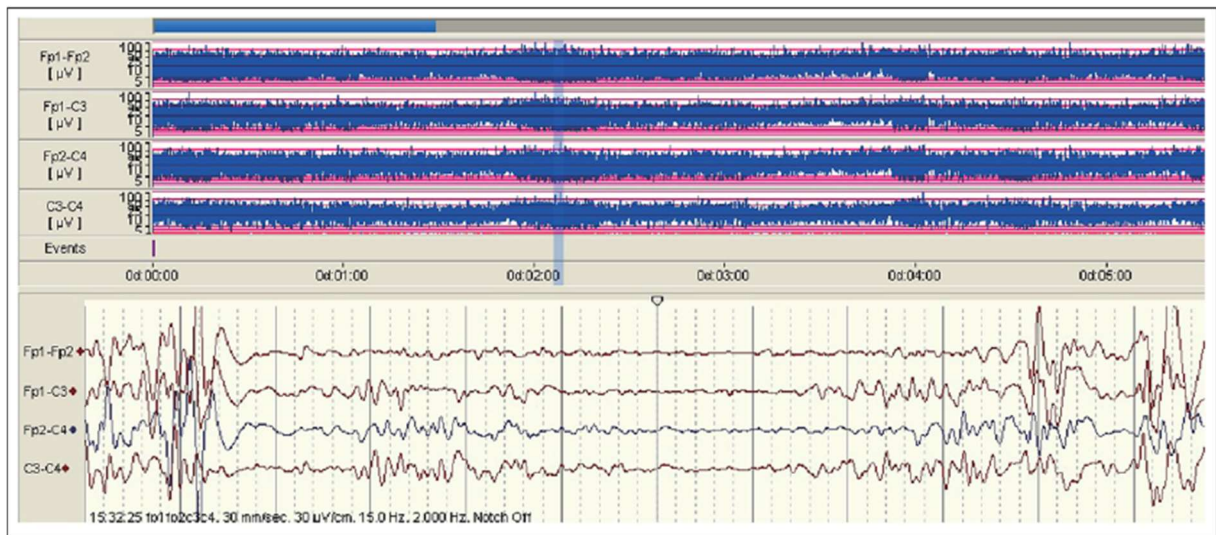


Figure 7. aEEG image of a premature infant without HE: it is visible a continuous background activity, which is associated with good prognoses. Adapted from [4].

7. Hypothermia as a Conventional Therapy

Hypothermia is the current standard neuroprotective strategy used to treat infants with moderate to severe HIE in developed countries [23]. The neuroprotective effects are multifactorial and includes not only the reduction in the metabolic activity of the brain, which allows the modulation of some damaging metabolic pathways triggered by HI, but also the suppression of oxidative stress, excitotoxicity, inflammation, atypical receptor activity, and cell death mechanisms [8].

The standard care used to treat neonates with moderate to severe HIE consists in 72 hours of cooling to 33.5°C to 35°C followed by a slow rewarming to normothermia. There are two types of hypothermia therapy, selective head cooling and whole-body hypothermia, which is the predominant, although there are no significant differences between both procedures in terms of efficacy [8] [12] [18].

It is well established the effectiveness of hypothermia when initiated within 6 hours of birth and continued for 72 hours in infants ≥ 36 weeks of gestation. It is important to start this procedure before the secondary phase of HIE to prevent the development of cytotoxic edema and brain damage [14].

Therapeutic hypothermia has reduced mortality and neurodevelopmental impairment from approximately 65% to 40-50%. However, this percentage of death or disability continues to be unacceptable [9] [23].

Since it is suggested that the current therapy protocols in clinical practice are of limited effectiveness, it is urgently needed the development of new therapeutic strategies for the management of HIE. It is of extreme importance that the new adjuvant therapies potentiate the effect of hypothermia and do not only exert a therapeutic effect via hypothermia [16].

Recent researches have been focused on the expansion of therapies that may be used in association with hypothermia, designed to perform at different levels of the pathophysiology cascade and to promote a synergy of therapies [16].

8. New Therapies

8.1. Magnesium Sulfate

Magnesium has a crucial role in cellular processes, moreover, it has the ability to influence mechanisms involved in cell death through the non-competitive inhibition of the NMDA receptor, reducing the Ca^{2+} influx and preventing an excitotoxic induced injury, and the production of proinflammatory cytokines during the inflammatory response [30].

Magnesium Sulfate (MgSO_4) is administered in women with a high risk of preterm labor to protect the immature brain of the fetus due to its neuroprotective effect of during prenatal period and the ability to reduce the risk of CP. Clinical trials support the idea that the exposure to MgSO_4 during the preterm period may be beneficial because of its ability to improve the oligodendrocyte differentiation and maturation through this important developing period. In this way, MgSO_4 makes the oligodendrocytes more resistant to HI injury and more able to achieve full recovery. This finding needs further investigation to elucidate its mechanisms of action, but has already showed evidence as a possible new therapy in the HI injury of preterm infants [31].

Despite the positive effects of MgSO_4 in the preterm population, evidences of pre-clinical and clinical studies conclude that the effects of this therapy in HI events during term do not have the same result, revealing a risk of hypotension due to the higher dose that need to be administered.

In conclusion, clinical trial of MgSO_4 in cases of encephalopathy at term would not be safe, regardless of the promising results showed in the preterm population. In order to obtain further information, it is essential to continue testing in animal models of HIE before starting trials in humans as a possible adjuvant therapy of hypothermia [30].

8.2. Cannabinoids

The endocannabinoid system has a key neuromodulatory role in numerous brain areas which is crucial for an adequate regulation of neuronal activity in mammals. This endogenous system involves target receptors, endogenous ligands and enzymes responsible for biosynthesis, transport and degradation of cannabinoids.

Since the levels of endocannabinoids in normal conditions are usually low and tend to drastically increase during a neuronal lesion, it is possible to conclude that not only endocannabinoids are involved in the normal development of the fetal brain and its functions, but it also can be considered a neuroprotector endogenous system.

Cannabidiol (CBD), a non-psychoactive component present in the *Cannabis sativa* plant, has caught many attentions since it was found evidence of neuroprotective properties both in vitro and in vivo models of neonatal HIE. CBD is a pleiotropic neuroprotectant, modulating the “deadly triad” that leads to HI-induced brain injury (excitotoxicity, neuroinflammation and oxidative stress).

CB1 receptors that are expressed from neural precursor (NPs) cells play a role in regulating cell proliferation and maturity. CB2 receptors are known for their action in the immune system and the control of neuroinflammation. It also has an indirect role in cell proliferation and neurogenesis since they are also expressed in NPs cells [32].

Despite a low affinity for CB1 and CB2 receptors, CBD interacts with these receptors at low concentrations, acting as an inverse agonist in both cases. The fact that CBD can act as an inverse agonist at the CB2 receptor site, may explain its anti-inflammatory properties [33]. Even though this cannabinoid does not regulate the mentioned receptors directly, it facilitates EC's (endocannabinoids) actions decreasing its degradation, thus, conferring neuroprotection. The action of cannabinoids at the CB1 receptor site plays an important role in encephalopathies by inducing cell-autonomous pro-survival signaling pathways and modulating injury-induced neurogenesis. As for CB2 receptors in the context of encephalopathies, its activity promotes neuroblast migration towards the injured cortex [32].

Studies with asphyxiated newborn piglets treated with a combination of hypothermia and CBD showed, after a 6 hours follow up, additive neuroprotective effects, regarding the modulation of excitotoxicity, neuroinflammation, oxidative stress and the decrease of biochemical or histological brain damage. However, to fully understand the effectiveness of this combination it is required a longer follow up study. From 5 to 24 hours after the HI event occurs the secondary energy failure, during this period numerous pathophysiological processes

that determinate the severity of the brain damage start. Since the 6h follow up is not possible to assess the secondary energy failure, the evaluation would not provide information about the final neuroprotective potential of the therapy.

8.3. Xenon

Xenon (Xe) is a rare and inert noble gas, currently used as an inhaled anesthetic, that also reveals neuroprotective properties. The neuroprotective effects are mediated by the inhibition of NMDA signaling, decreasing neuronal apoptosis [23].

Revealing antiexcitotoxic and antiapoptotic properties, xenon also has the capacity to cross the BBB rapidly, due to a low blood/gas partition coefficient.

Studies with Xe have already proven its neuroprotective properties both in vitro and in vivo. It has been previously reported that the immediate combination of Xe with hypothermia increases the neuroprotective effect of this conventional treatment after induced HI in neonatal rats and newborn pigs from 35% to 70%. The results were based on a MRS evaluation that exposed a reduced Lac/NAA ratio, which has already been demonstrated to be a respectable predictive imaging biomarker of neurodevelopmental outcomes. Additionally, the concomitant therapy did not show any adverse respiratory and cardiovascular effects [34].

However, it is important to refer that is rarely feasible to initiate both therapies immediately after the injury in clinical settings. Thus, it is crucial to investigate the therapeutic window for this combined treatment [34].

Unfortunately, Xe reveals two main limitations. Firstly, the available fractional concentration of oxygen is reduced with the inhalation of Xe, therefore it cannot be used in newborns who required a high fraction of inspired oxygen. Secondly, it is an expensive noble gas and requires a specific delivery system [16].

8.4. Neurosteroids

Neuroactive steroids, commonly known as neurosteroids, are crucial endogenous molecules synthesized in the CNS that are able to produce alterations on neuronal excitability and myelination. Due to their highly lipophilic structure, they can easily cross the blood-brain barrier. Cholesterol and circulating steroids, such as progesterone and deoxycorticosterone, are the main precursors for their synthesis, via progressive A-ring reductions, in glia and neurons localized in many brain regions, including hippocampus and neocortex. Additionally,

all the enzymes that are necessary to the biosynthesis of neurosteroids, which is controlled by a translocator protein named TSPO, are present in the brain [35].

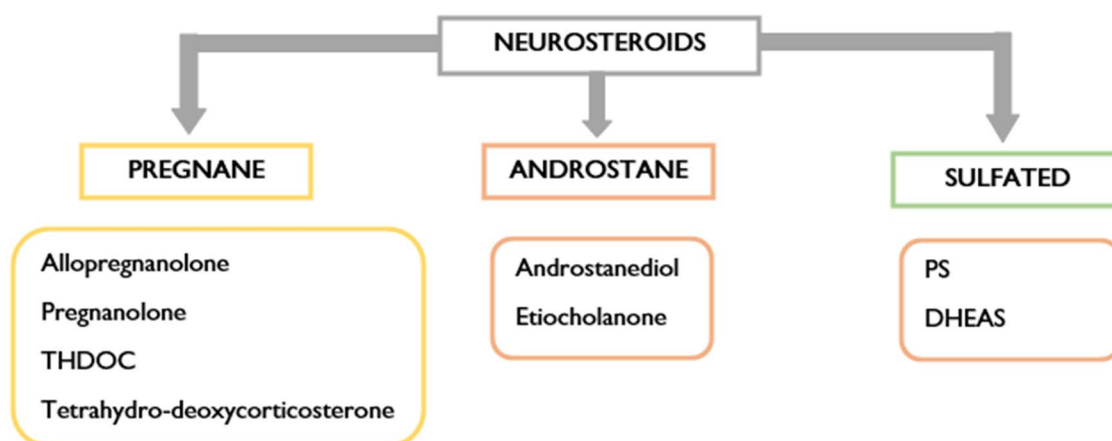


Figure 8. Classification of the three main classes of neurosteroids in the brain based on their structure. Adapted from [35].

While pregnane and androstane classes interact more with the GABA-A receptor, the sulfated neurosteroids have the ability to interact with a wider variety of receptors, including the NMDA receptors [36].

8.4.1. Neurosteroids as modulators of the NMDA receptor

NMDA receptors can be positive or negatively affected by exogenous and endogenous molecules, including neurosteroids [35].

While a positive allosteric modulator may provide a new therapeutic approach for patients that suffer from neurological disorders caused by a NMDAR hypofunction, such as schizophrenia or autism spectrum disorder, negative allosteric modulators can play a critical role in various neuropathological conditions caused by the overactivation of the NMDAR, which ultimately leads to glutamate excitotoxicity and cell death. These different effects are related to the stereochemistry of the neurosteroid compound [37].

The inhibitory effect is dependent upon a 5β -stereochemistry, the single unsaturated bond between rings A and B originates an accentuated bent, which makes the neurosteroid structure less planar (Figure 9). Additionally, a 3α negatively charged substituent is crucial to maintain an inhibitory activity. These group of neurosteroids is represented by an endogenous compound named pregnanolone sulfate (20-oxo- 5β -pregnan- 3α -yl sulfate) [38] [39].

In contrast, the more planar arrangement associated with the 5α -pregnanes, due to the double bond between C-5 and C-6, in combination with a 3β - negatively charged moiety

favors the potentiation of the receptor (Figure 9). These group of neurosteroids is represented by an endogenous compound named pregnenolone sulfate (20-oxo-pregn-5-en-3 β -yl sulfate). The mechanism of action of this compound involves an increase in the peak probability of the NMDA receptor opening, however, the positive effect of the PS is disuse dependent, contrarily to the PS(3 α 5 β S) , which means that when the NMDA receptor is activated, the PS affinity to the receptor is decreased, therefore has a weak inhibitory effect [37] [38].

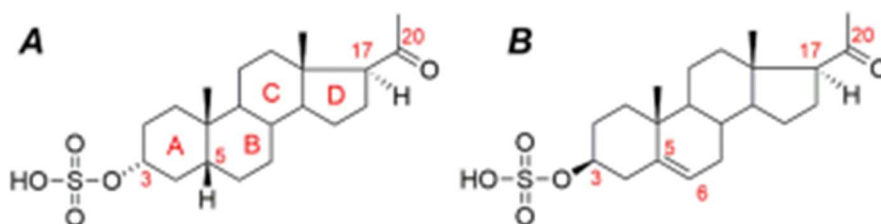


Figure 9. Structure of (A) pregnanolone sulfate and (B) pregnenolone sulfate. Adapted from [•38]

Scientific studies have already proved the extreme importance of the sulfate moiety at position C-3 in inhibitory compounds, however, this group is extremely susceptible to hydrolysis by sulfatases, which makes it an unstable neurosteroid. The possibility of substituting the pregnane acetyl group of the D- ring with a variety of non-polar substituents, while maintaining biological activity, lead to the discovery of new NMDA receptor inhibitors even more potent than the original PS(3 α 5 β S). Thus, it is possible to synthesize a more metabolically stable compound that is able to penetrate the CNS without suffering metabolic degradation [38].

Despite all the new discoveries made in the neurosteroids field, there are a lot of questions that still need answer, for example, the impact of the lipophilicity of these compounds when they cross the BBB, however, the fact that it does not induce psychotomimetic symptoms and their structural flexibility allows scientists to have motivation to search for further modifications and optimizations on the pharmacological and pharmacokinetic field of these new inhibitor neurosteroids [38]

9. Conclusion

HIE is one of the main causes of mortality and morbidity in the newborn. Despite the evolution in global healthcare, the incidence of this worldwide problem is not decreasing, being the number of children with permanent disabilities still really high. For this reason, it is extremely important to continue the investigation and development of new and effective neuroprotective strategies, in order to minimize the consequences of this unfortunate event.

Nowadays the gold standard therapy in these cases is induced hypothermia, which is not 100% effective, due to the complexity of this pathological event, thus it is important to combine this therapy with other therapeutic approaches in order to attack numerous targets at the same time.

Recent studies have already identified a significant number of innovative molecules as possible adjuvants to hypothermia, including magnesium sulfate, cannabidiol, xenon and neurosteroids. Despite the importance to attack different steps of the HI insult, in this review the focus was the therapies against glutamate excitotoxicity, since it is considered the trigger of a HI event.

It is important to refer that the moment of administration is extremely critical, so in order to optimize the benefit and prevent neurotoxicity it is essential to continue to develop more sensitive diagnostic methods to do an earlier diagnose and to identify the optimal therapeutic window.

The new therapies reviewed in this dissertation, alone or in combination, still need deeper investigation in both pre-clinical and clinical level. The precise therapeutic target, via and duration of the administration are still not totally clear so, to have the best results and the lowest number of adverse effects, these parameters must be study rigorously.

Despite all the development in new therapies for HIE, firstly, it is important to keep in mind that none of these studies was directly done in a newborn, so the results can be disappointing in a clinical scenario. Secondly, the risk-benefit ratio must be always taken into account, because some therapies, both in mono or combined therapy, can prejudice the development of the brain in long term, so it is crucial to find perfect strategies that do not put in risk the normal neuronal development of the immature brain.

10. Bibliography

- [1] EDWARDS, A. B., ANDERTON, R. S., KNUCKEY, N. W., MELONI, B. P. - Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy and neuroprotective peptide therapies: A case for cationic arginine-rich peptides (CARPs). *Brain Sciences*. 8, 8 (2018) 15–20.
- [2] JIA, M., NJAPO, S. A. N., RASTOGI, V., HEDNA, V. S. - Taming glutamate excitotoxicity: Strategic pathway modulation for neuroprotection. *CNS Drugs*. 29, 2 (2015) 153–162.
- [3] DANG, Y. X., SHI, K. N., WANG, X. M. - Early changes in glutamate metabolism and perfusion in basal ganglia following hypoxia-ischemia in neonatal piglets: A multi-sequence 3.0t MR study. *Frontiers in Physiology*. 8, APR (2017) 1–11.
- [4] ZHU, X., GUO, Y., LIU, Y., LIU, K. - Amplitude-integrated electroencephalography for early diagnosis and prognostic prediction of hypoxic encephalopathy in preterm infants. *Med. Sci. Monit*. 24 (2018) 8795–8802.
- [5] ZEN LEE, C. Y., CHAKRANON, P., HUEY LEE, S. W. - Comparative efficacy and safety of neuroprotective therapies for neonates with hypoxic ischemic encephalopathy: A network meta-analysis. *Front. Pharmacol*. 10, October (2019) 1221.
- [6] JUUL, S. E., FLEISS, B., MCADAMS, R. M., GRESSENS, P. - Neuroprotection Strategies for the Newborn. In: KENNER, C., ALTIMIER, L., BOYCOVA, M. V., *Comprehensive Neonatal Nursing Care*, New Jersey: Springer Publishing Company, 2019. ISBN: 0826139140, 9780826139146. p. 910–921.
- [7] HASSEL, K. J., EZZATI M., ALONSO- ALCONADA, D., HAUSENLOY, D. J., ROBERTSON, N. J. - New horizons for newborn brain protection: Enhancing endogenous neuroprotection. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed*. 100, 6 (2015) F541–F551.
- [8] GRECO, P., NENCINI, G., PIVA, I., SCIOSCIA, M., VOLTA, C. A., SPADARO, S., NERI, M., BONACCORSI, G., GRECO, F., COCCO, I., SORRENTINO, F., D'ANTONIO, F., NAPPI, L. - Pathophysiology of hypoxic–ischemic encephalopathy: a review of the past and a view on the future. *Acta Neurol. Belgica*. 120, 2 (2020) 277–288.
- [9] WANG, Q., LV, H., LU, L., REN, P., LI, L. - Neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy: emerging therapeutic strategies based on pathophysiologic phases of the injury. *J. Matern. Neonatal Medicine*. 32, 21 (2019) 3685–3692.

- [10] PREGNOLATO, S., CHAKKARAPANI, E., ISLES, A. R., LUYT, K. - Glutamate transport and preterm brain injury. *Front. Physiol.* 10, APR (2019).
- [11] HIROSE-IKEDA, M., CHU, B., ZHAO, P., AKIL, O., ESCALANTE, E., VERGNES, L., CEPEDA, C. - Trophic factors are essential for the survival of grafted oligodendrocyte progenitors and for neuroprotection after perinatal excitotoxicity. *Neural Regen. Res.* 15, 3 (2020) 557–568.
- [12] DOUGLAS-ESCOBAR, M., WEISS, M. D. - Hypoxic-Ischemic Encephalopathy A Review for the Clinician. *JAMA Pediatr.* 169, 4 (2015) 397–403.
- [13] VAN BEL, V., GROENENDAAL, F. - Drugs for neuroprotection after birth asphyxia: Pharmacologic adjuncts to hypothermia. *Semin. Perinatol.* 40, 3 (2016) 152–159.
- [14] LAPTOOK, A. R. - Birth Asphyxia and Hypoxic-Ischemic Brain Injury in the Preterm Infant. *Clin. Perinatol.* 43, 3 (2016) 529–545.
- [15] GILLES, F., GRESSENS, P., DAMMANN, O., LEVITON, A. - Hypoxia–ischemia is not an antecedent of most preterm brain damage: the illusion of validity. *Dev. Med. Child Neurol.* 60, 2 (2018) 120–125.
- [16] CÁNOVAS-AHEDO, M., ALONSO-ALCONADA, D. - Combined therapy in neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy. *An. Pediatria English Ed.* 91, 1 (2019) 59–59.e6.
- [17] DISDIER, C., STONESTREET, B. S. - Hypoxic-ischemic-related cerebrovascular changes and potential therapeutic strategies in the neonatal brain. *J. Neurosci. Res.* 98, 7 (2020) 1468–1484.
- [18] BONIFACIO, S. L., VANMEURS, K. - CHAPTER 18 Neuroprotective Therapies in Infants. In: BENITZ, W. E., SMITH, P. B., Infectious Disease and Pharmacology, Elsevier Inc., 2015. ISBN: 978-0-323-54391-0. p. 227–241.
- [19] ZHOU, Y., DANBOLT, N. C. - Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J. Neural Transm.* 121, 8 (2014) 799–817.
- [20] BANO, D., ANKARCRONA, M. - Beyond the critical point: An overview of excitotoxicity, calcium overload and the downstream consequences. *Neurosci. Lett.* 663, June 2017 (2018) 79–85.
- [21] VANDENBERG, R. J., RYAN, R. M. - Mechanisms of glutamate transport. *Physiol. Rev.* 93, 4 (2013) 1621–1657.

- [22] YIN, A., GUO, H., TAO, L., CAI, G., WANG, Y., YAO, L., XIONG, L., ZHANG, J., LI, Y. - NDRG2 Protects the Brain from Excitotoxicity by Facilitating Interstitial Glutamate Uptake. *Transl. Stroke Res.* 11, 2 (2020) 214–227.
- [23] PARIKH, P., JUUL, S. E. - Neuroprotective Strategies in Neonatal Brain Injury. *J. Pediatr.* 192 (2018) 22–32.
- [24] COUNSELL, S. J., ARICHI, T., ARULKUMARAN, S., RUTHERFORD, M. A. *Fetal and neonatal neuroimaging*. In: DE VRIES, L. S., GLASS, H. C., *Handbook of Clinical Neurology*, Elsevier B.V., 2019, ISBN: 978-0-444-64029-1. p. 67–103.
- [25] WALSH, B. H., INDER, T. E. - MRI as a biomarker for mild neonatal encephalopathy. *Early Hum. Dev.* 120 (2018) 75–79.
- [26] TRIVEDI, S. B., VESOULIS, Z. A., RAO, R., LIAO, S. M., SHIMONY, J. S., MCKINSTRY, R. C., MATHUR, A. M. - A validated clinical MRI injury scoring system in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatr. Radiol.* 47, 11 (2017) 1491–1499.
- [27] CHENG, Z., ZHANG, T., ZHENG, J., DING, W., WANG, Y., LI, Y., ZHU, L., MURRAY, M., ZHOU, F. - Betulinic acid derivatives can protect human Müller cells from glutamate-induced oxidative stress. *Exp. Cell Res.* 383, 1 (2019) 111509.
- [28] BERGER, H. R., BREKKE, E., WIDEROE, M., MORKEN, T. S. Neuroprotective Treatments after Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury Evaluated with Magnetic Resonance Spectroscopy. *Dev. Neurosci.* 39, 1–4 (2017) 36–48.
- [29] MILLER, J. H., BARDO, D. M. E., CORNEJO, P. - Neonatal Neuroimaging. *Semin. Pediatr. Neurol.* 33 (2020) 100796.
- [30] LAKATOS, L., BALLA, G. - Comment on ‘New antioxidant drugs for neonatal brain injury’. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015 (2015) 1–13.
- [31] ITOH, K., MAKI, T., SHINDO, A., EGAWA, N., LIANG, A. C., ITOH, N., LO, H., LOK, J., ARAI, K. - Magnesium sulfate protects oligodendrocyte lineage cells in a rat cell-culture model of hypoxic-ischemic injury. *Physiol. Behav.* 176, 1 (2017) 139–148.
- [32] SAGREDO, O., PALAZUELOS, J., GUTIERREZ-RODRIGUEZ, A., SATTA, V., GALVE-ROPERH, I., MARTÍNEZ-ORGADO, J. - Cannabinoid signalling in the immature brain: Encephalopathies and neurodevelopmental disorders. *Biochemical Pharm.* 157 (2018) 85–96.

- [33] PERTWEE, R. - The diverse CB 1 and CB 2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol.* 153, 2 (2008) 199–215.
- [34] LIU, X., DINGLEY, J., SCULL-BROWN, E., THORESEN, M. - Adding 5 h delayed xenon to delayed hypothermia treatment improves long-term function in neonatal rats surviving to adulthood. *Pediatr. Res.* 77, 6 (2015) 779–783.
- [35] REDDY, D. S., BAKSHI, K. - *Neurosteroids: Biosynthesis, Molecular Mechanisms, and Neurophysiological Functions in the Human Brain*. In: GERALD, L., *Hormonal Signaling in Biology and Medicine: Comprehensive Modern Endocrinology*, Elsevier Inc., 2019, ISBN: 9780128138151. p. 69–82.
- [36] RAHMANI, B., GHASEMI, R., DARGAHI, L., AHMADIANI, A. HAERI, A. - Neurosteroids; potential underpinning roles in maintaining homeostasis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 225 (2016) 242–250.
- [37] KRAUSOVA, B., SLAVIKOVA, B., NEKARDOVA, M., HUBALKOVA, P., VYKLIČKY, V., CHODOUNSKA, H., VYKLIČKY, L., KUDOVA, E. - Positive Modulators of the N-Methyl-D-aspartate Receptor: Structure-Activity Relationship Study of Steroidal 3-Hemiesters. *J. Med. Chem.* 61, 10 (2018) 4505–4516.
- [38] KUDOVA, E., CHODOUNSKA, H., SLAVIKOVA, B., BUDESINSKY, M., NEKARDOVA, M., VYKLIČKY, V., KRAUSOVA, B., SYEHLA, P., VYKLIČKY, L. - A New Class of Potent N-Methyl-D-Aspartate Receptor Inhibitors: Sulfated Neuroactive Steroids with Lipophilic D-Ring Modifications. *J. Med. Chem.* 58, 15 (2015) 5950–5966.
- [39] SMIDKOVA, M., HAJEK, M., ADLA, S. K., SLADIKOVA, B., CHODOUNSKA, H., MATOUSOVA, M., MERTLIKOVA-KAISEROVA, H., KUDOVA, E. - Screening of novel $3\alpha,5\beta$ -neurosteroids for neuroprotective activity against glutamate- or NMDA-induced excitotoxicity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 189, January (2019) 195–203.