



UNIVERSIDADE DE ÉVORA  
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

## **Métodos imunoenzimáticos na deteção de marcadores metabólicos de malignidade**

Carlos David da Fonseca Valverde

Orientação: Mestre Luís António Carvalho Rodrigues

Coorientação: Prof. Doutor Rui Manuel Alves Ferreira

Mestrado em Bioquímica

Relatório de Atividade Profissional

Évora, 2013





UNIVERSIDADE DE ÉVORA  
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

# **Métodos imunoenzimáticos na deteção de marcadores metabólicos de malignidade**

Carlos David da Fonseca Valverde

Orientação: Mestre Luís António Carvalho Rodrigues

Coorientação: Prof. Doutor Rui Manuel Alves Ferreira

Mestrado em Bioquímica

Relatório de Atividade Profissional

Évora, 2013



## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a todos os que acreditaram e continuam a acreditar no meu valor, e nas minhas habilitações enquanto profissional de saúde.

Agradeço de forma indiscutível ao meu orientador e coorientador Dr. Luís Rodrigues e Prof. Doutor Rui Ferreira respetivamente, pela forma humana e profissional como sempre me trataram.

Um muito obrigado também, a todos os profissionais com que me cruzei no meu percurso académico e profissional, pois sem eles não seria o que sou hoje.

Por último, mas não menos importante, gostaria agradecer a oportunidade que a Universidade de Évora me deu, ao participar neste curso de Mestrado, cujo plano de estudos considero riquíssimo.

Sem dúvida, com este grau académico, irei aumentar as minhas competências na área da Bioquímica Clínica, a qual faz parte do meu dia-a-dia.



## Índice

Agradecimentos.....	i
Índice .....	iii
Índice de figuras .....	v
Índice de quadros .....	v
Lista de abreviaturas e nomenclatura de Enzimas.....	vii
Resumo .....	ix
Abstract.....	xi
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Apresentação do Tema.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Antígenos, Imunogénios e Anticorpos .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Enzimas e Substratos .....</b>	<b>5</b>
2.2.1. Características dos enzimas como marcadores .....	7
<b>2.3. Marcadores tumorais.....</b>	<b>9</b>
2.3.1 Marcadores tumorais realizados em contexto profissional.....	11
2.3.1.1 - TPSA .....	11
2.3.1.2 - FPSA .....	12
2.3.1.3 - CA15-3.....	12
2.3.1.4 - CEA(s) .....	12
2.3.1.5 - CA 19-9.....	13
2.3.1.6 - CA 125 .....	13
<b>2.4. Automatização em Laboratório - Ensaio Imunoquímico .....</b>	<b>15</b>
2.4.1 Enzimoimunoensaio (EIA) .....	18
2.4.1.1 ELISA não competitivo.....	18
2.4.1.2 Procedimentos .....	22
2.4.1.2.1- TPSA.....	22
2.4.1.2.2 - FPSA.....	22
2.4.1.2.3 - CA15-3 .....	23
2.4.1.2.4 - CEA(S) .....	24
2.4.1.2.5 - CA19.9 .....	25
2.4.1.2.6 - CA 125 .....	26

<b>2.5. Controlo da Qualidade .....</b>	<b>28</b>
<b>2.6. Discussão/Conclusão .....</b>	<b>31</b>
<b>2.7. Bibliografia .....</b>	<b>33</b>
<b>3. Curriculum Vitae .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Introdução.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2. Dados Bibliográficos .....</b>	<b>38</b>
<b>3.3. Percurso Académico .....</b>	<b>39</b>
<b>3.4. Formação Profissional de Base .....</b>	<b>40</b>
<b>3.5. Formação Profissional Complementar .....</b>	<b>41</b>
3.5.1. Ações de Formação .....	41
3.5.1.1. Curso de âmbito profissional com avaliação .....	41
3.5.1.2. Curso de âmbito profissional sem avaliação .....	41
3.5.1.3. Curso de âmbito geral com avaliação .....	42
3.5.1.4. Outras Formações em Serviço .....	42
<b>3.6. Jornadas, Congressos e outros eventos .....</b>	<b>44</b>
<b>3.7. Carreira Profissional.....</b>	<b>45</b>
<b>3.8. Atividade Profissional .....</b>	<b>47</b>
<b>3.9. Trabalhos Documentais Realizados .....</b>	<b>53</b>
<b>3.10. Atividade de Administração/Gestão.....</b>	<b>54</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>55</b>

## Índice de figuras

Fig. 1 – Representação estrutural de um anticorpo (adaptado de Letonturier, 2004).....	3
Fig. 2 - Níveis de organização estrutural das proteínas (adaptado de Pádua, 2005) .....	5
Fig. 3 – Formação do complexo enzima-substrato (adaptado de Moss, 2000) .....	6
Fig. 4 – Classificação de enzimas - Comissão de enzimas da IUBMB (adaptado de McDonald, 2008) .....	6
Fig. 5 – Classificação de Imunoensaios com marcador (adaptado de Hens, 2010) .....	16
Fig. 6 – Esquema de Imunoensaios homogénio (adaptado de Hens, 2010) .....	17
Fig. 7 - ELISA em <i>Sandwich</i> direto com captura de Ag (adaptado de Hans, 2006) .....	19
Fig. 8 - Equipamento VIDAS – Biomerieux ( <a href="http://www.biomerieux-diagnostics.com">www.biomerieux-diagnostics.com</a> ) .....	19
Fig. 9 - Cone (SPR) e Cartuxo do sistema ( <a href="http://www.biomerieux-diagnostics.com">www.biomerieux-diagnostics.com</a> ) .....	21
Fig. 10 - Esquema resumo da técnica ELFA ( <a href="http://www.biomerieux-diagnostics.com">www.biomerieux-diagnostics.com</a> ).....	21
Fig. 11 - Esquema do Sistema MEIA (adaptado de Hans, 2006).....	27

## Índice de quadros

Quadro 1 – Enzimas utilizados como marcadores para Acs. e outras biomoléculas (adaptado de Walker, 1992) .....	7
Quadro 2 – Classificação de marcadores tumorais em relação à sua origem (adaptado de Filella, 2010) .....	10
Quadro 3 – Fases Analíticas (adaptado de Westgard, 2000) .....	15
Quadro 4 - Classificação das Técnicas Imunoquímicas (adaptado de Hens, 2010).....	16
Quadro 5 – Tipos de ensaios heterogéneos e sua aplicabilidade (adaptado de Hens, 2010).....	17
Quadro 6 - Descrição da TPSA ( <a href="http://www.biomerieux-diagnostics.com">www.biomerieux-diagnostics.com</a> ).....	22
Quadro 7 - Descrição da FPSA ( <a href="http://www.biomerieux-diagnostics.com">www.biomerieux-diagnostics.com</a> ).....	23
Quadro 8 - Descrição da CA 15-3 ( <a href="http://www.biomerieux-diagnostics.com">www.biomerieux-diagnostics.com</a> ) .....	24
Quadro 9 - Descrição da CEA(S) ( <a href="http://www.biomerieux-diagnostics.com">www.biomerieux-diagnostics.com</a> ) .....	25
Quadro 10 - Descrição da CA 19-9 ( <a href="http://www.biomerieux-diagnostics.com">www.biomerieux-diagnostics.com</a> ) .....	26
Quadro 11 - Descrição da CA 125 ( <a href="http://www.biomerieux-diagnostics.com">www.biomerieux-diagnostics.com</a> ) .....	27



## **Lista de abreviaturas e nomenclatura de Enzimas**

**AFP** – Alfa-feto proteína

**CEA** – Antígeno carcino-embrionário

**βHCG** – Hormona gonadotrofina coriônica

**CA 15-3** – Antígeno de carcinoma 15-3

**CA 19-9** – Antígeno de carcinoma 19-9

**CA 72-4** - Antígeno de carcinoma 72-4

**TGL** - Tiroglobulina

**ACTH** - Hormona adrenocorticotrófica

**ADH** - Hormona antidiurética

**NSE** - Enolase neuro-específica

**FAP** - Fosfatase ácida prostática – EC 3.1.3.2

**TPSA** - Antígeno prostático específico

**FPSA** - Antígeno prostático específico livre

**LDH** - Lactato desidrogenase – EC 1.1.1.27

**Her-2-neu** – Fator de crescimento humano epidermal recetor-tipo 2

**TPA** - Antígeno polipeptídico tecidual

**TPS** - Antígeno polipeptídico específico

**SPR** - Recetáculo de fase sólida

**PLAP** - Fosfatase alcalina placentária – EC 3.1.3.1

**RIA** - Radioimunoensaio

**EIA** - Enzimoimunoensaio

**FIA** - Fluorimunoensaio

**LIA** - Imunoensaio quimioluminescente

**EMIT** – Técnicas de imunoensaio de multiplicação, do inglês *Enzyme-multiplied immunoassay Techniques*

**ELISA** – Técnicas imunoenzimáticas do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assays*

**MEIA** – Imunoensaio de micropartícula enzimáticas, do inglês *Microparticle Enzyme Immunoassay*

**ADA** - Adenosina desaminase - EC 3.5.4.4

**ALP** - Fosfatase alcalina - EC 3.1.3.1

Alfa-amilase - EC 3.2.1.1

Luciferina bacteriana - EC 1.13.12.7

$\beta$ - Amilase - EC 3.2.1.2

$\beta$ - Lactamase - EC 3.5.2.6

Anidrase carbónica - EC 4.2.1.1

Catalase - EC 1.11.1.6

Luciferase - EC 1.13.12.7

Glucose Oxidase - EC 1.1.3.4

Glucose-6-fosfato desidrogenase - EC 1.1.1.49

Henocinase - EC 2.7.1.1

Peroxidase de rábano (HRP) - EC 1.11.1.7

Invertase - EC 3.2.1.26

Lisozima - EC 3.2.1.17

Malato desidrogenase - EC 1.1.1.37

Fosfolipase C - EC 3.1.4.11

Piruvato cinase - EC 2.7.11.2

Ribonuclease A - EC 3.1.27.5

## Resumo

Este relatório de atividade profissional, tem como principal intuito descrever o percurso profissional realizado por Carlos David da Fonseca Valverde enquanto Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica, tendo por objeto de estudo métodos imunoenzimáticos na deteção de marcadores metabólicos de malignidade. Neste sentido, pode referir-se que o candidato tem desenvolvido a referida atividade em laboratórios Hospitalares de Patologia Clínica, ao longo de 10 anos, onde a valência de Bioquímica se encontra presente diariamente, e a qual possui elevado significado em contexto laboratorial. Destaca-se ainda que integrou também, uma multinacional (Siemens) enquanto Especialista de Aplicações de equipamentos Laboratoriais na área da Química Clínica, durante a qual a sua componente académica e científica exigiram um rigor e competências equivalentes ao grau a obter neste Ciclo de Estudos da Universidade de Évora. Ao longo da sua experiência profissional, mais concretamente enquanto representante das Tecnologias da Saúde, no conselho Técnico da Unidade de Saúde onde desempenha funções atualmente, verifica diariamente que a atualização permanente de componentes Tecnológicas é crucial para o correto desempenho das suas funções.

A análise estatística realizada em países desenvolvidos revela que uma das principais causas de morte da atualidade são patologias de foro Oncológico. Desta forma, esta problemática merece toda a atenção por parte dos profissionais que de alguma forma lidam com este assunto. Assim sendo, e devido ao grau de importância do tema escolhido, irão ser apresentadas as técnicas imunoenzimáticas (EIA) realizadas em laboratório em contexto profissional, com mais significado em contexto clínico neoplásico.

O Laboratório de Patologia Clínica revela-se algo de extrema relevância, uma vez que, os dados transmitidos aos clínicos são de relevante importância. Através deles um melhor tratamento no campo do diagnóstico e da atuação terapêutica num paciente oncológico poderá fazer sem dúvida toda a diferença. Assim, apresentar as tecnologias laboratoriais do foro bioquímico, que permitam o estudo oncológico é sem dúvida pertinente nos dias que decorrem.



## Immunoenzymatic methods in detection of metabolic markers of malignancy

### **Abstract**

This Professional report describe the career of Carlos David Fonseca Valverde as Senior Biomedical Technologist. The subject of this study it's based on the immunoenzymatic methods for the detection of metabolic markers of malignancy. In this sense, it can be noted that the candidate has developed such activity over ten years in Clinical Pathology Laboratories, where the valence of Biochemistry is present daily, and has high significance in laboratory context. He integrated as well, a multinational (Siemens) as Applicant Specialist, working with laboratory clinical chemistry equipments, where his academic component and scientific rigor demanded skills, were equivalent to the level to get through in this cycle of studies, at the University of Évora. As Technologies Representative, in the Health Unit which performs functions currently, the continuous updating of technical components is crucial for the proper performance of their duties.

The statistical analysis carried out in developed countries reveals that oncological pathologies, represent a common cause of mortality in the world. Therefore, this issue deserves special attention of all the professionals that deal with this issue. Due to the importance of the chosen topic, immunoenzymatic techniques (EIA) carried out in the laboratory, will be presented and will be explored the meaningful tumor markers in clinical context.

The laboratory is critical by transmitting data to physicians. Through them, a better treatment in the field of diagnosis and therapeutic activity in cancer patients, makes all the difference. Present laboratory technologies, allow the cancer study and it's certainly relevant in the days that arise.



## 1. Introdução

As patologias de foro oncológico representam atualmente as maiores causas de mortalidade mundial. Assim sendo, esta problemática deve ser aprofundada em permanência por parte dos profissionais de saúde. Os resultados laboratoriais transmitidos aos clínicos, são de enorme importância pois permitem o diagnóstico dessas patologias ou tornam possíveis a monitorização dos tratamentos adequados à situação clínica de cada utente (Filella, 2010).

Este relatório subdividir-se-á do seguinte modo:

1. Breve revisão de alguns conceitos teóricos no domínio da bioquímica e imunologia, sem a qual o claro entendimento dos protocolos descritos, não seria possível.

2. Identificação e caracterização de marcadores metabólicos de malignidade, ditos marcadores tumorais, determinados laboratorialmente, aprofundando os aspetos teóricos dos mesmos.

3. Caracterização da automatização das técnicas Imunoenzimáticas em contexto profissional, tendo em conta a sua ampla disseminação em laboratório clínico nos dias de hoje (Fitzpatrick, 2008).

No que respeita à exposição dos processos laboratoriais foram tidos em consideração os procedimentos analíticos efetuados, desde o momento da colheita do material biológico até à emissão de resultados analíticos, sendo relatados *a posteriori* os critérios processuais adotados para garantir a sua qualidade (Westgard, 2010). Seguidamente são avaliadas com sentido crítico as técnicas desenvolvidas e apontada a sua importância no desenvolvimento profissional e académico do mestrando. Por fim, apresentar-se-á a descrição detalhada do *Curriculum Vitae* do candidato, para demonstrar as suas competências relativas na obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

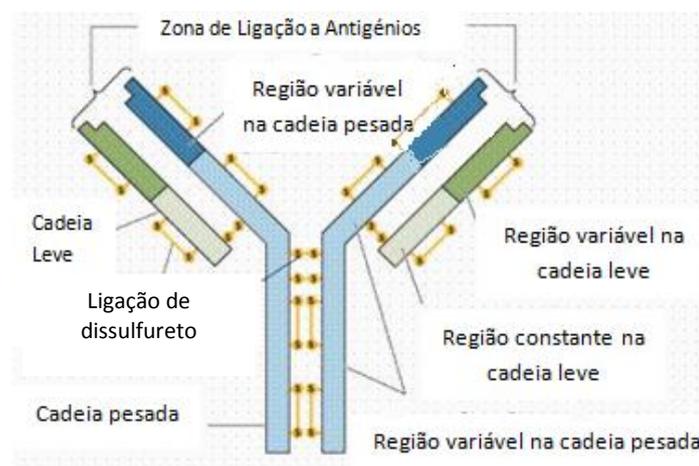


## 2. Apresentação do Tema

### 2.1. Antígenos, Imunogénios e Anticorpos

Atualmente o termo imunogénio tende a designar qualquer substância que, injetada num organismo, seja capaz de induzir resposta imunitária, seja ela do tipo humoral ou de mediação celular. O termo antígeno aplica-se a qualquer molécula capaz de ser reconhecida de forma específica pelo sistema imunitário, isto é, pelas células T, pelas células B ou pelos dois tipos de células. De acordo com estas convenções, a mesma molécula pode ser imunogénica e antigénica, apesar de algumas substâncias, como os haptenos, capazes de se combinarem com proteínas do organismo serem apenas antigénicas (Kricka, 2000). Os imunogénios são desta forma um subgrupo incluído no conjunto dos antígenos. Cada região única da molécula do antígeno que reconhece um anticorpo particular denomina-se epítopo, ou determinante antigénico (Hens, 2006).

Os anticorpos (Fig.1), conhecidos também como imunoglobulinas, são estruturas proteicas muito heterogéneas produzidas pelos organismos superiores na resposta a um estímulo molecular exógeno. Quando expostos à presença dos antígenos que lhes deram origem, como por exemplo, proteínas, glícidos entre outros, reconhecem-nos especificamente, tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta propriedade tornou-se fundamental para o desenvolvimento de técnicas comuns de laboratório (Fitzpatrick, 2008). Do ponto de vista estrutural as imunoglobulinas são proteínas constituídas por cadeias polipeptídicas unidas entre si por ligações dissulfureto, bem como por outro tipo de interações mais fracas como as de hidrogénio, hidrófobas ou de Van der Waal (Letonturier, 2004).



**Fig. 1** – Representação estrutural de um anticorpo (adaptado de Letonturier, 2004)

A imunoglobulina G (IgG), uma glicoproteína com massa molecular 160 kD, é o anticorpo mais utilizado na atualidade, composto por duas cadeias leves ( $\lambda$ ) e duas cadeias pesadas ( $\gamma$ ) ligadas entre si por ligações dissulfureto criando um eixo de simetria (Fig. 1) (Fitzpatrick, 2008).

A sequência variável de aminoácidos, na extremidade N-terminal de cada cadeia, determina a especificidade antigénica daquele anticorpo em particular. Conhecem-se anticorpos originários de diferentes linhagens de linfócitos B, designados *Policlonais* que reagem com vários epitopos de um antígeno; e anticorpos *Monoclonais* (Kricka 2000). Estes últimos, possuem especificidade definida e são possíveis de se produzir em largas quantidades podendo ser obtidos por imortalização de linfócitos B, clonados e expandidos em culturas celulares contínuas designadas Hibridomas (Sinogas, 2012).

Em 1975 Kohler e Milsten descobriram e empregaram pela primeira vez a tecnologia dos hibridomas. Fizeram combinar o material genético de células normais produtoras de anticorpos, com o de células de origem maligna da mesma linhagem. Hibridomas, são como o nome indica, células híbridas imortalizadas em culturas de tecidos, produtoras de anticorpos monoclonais com especificidade única e pré determinada pelo processo da sua preparação (Sinogas, 2012).

A primeira etapa para o desenvolvimento de um Imunoensaio implica a disponibilidade de um anticorpo adequado. Muitos destes ensaios só requerem anticorpos policlonais, mas normalmente prefere-se os monoclonais.

A força ou a energia de interação entre o anticorpo e o antígeno é descrita por dois termos: a afinidade, grandeza termodinâmica que define a energia de interação de um só local de combinação do anticorpo com o seu correspondente epítipo no antígeno, e a *avidez*, a força global de ligação do anticorpo ao antígeno que inclui a soma das afinidades de ligação de todos os locais individuais de combinação no anticorpo (Letontrier, 2004). Sendo este tipo de reações a base do nosso objeto de estudo, falta referir que, recorre-se em conjunto a reações enzimáticas, para alcançar os resultados laboratoriais desejados.

## 2.2. Enzimas e Substratos

O processo de obtenção de energia, assim como, o processo de síntese de macromoléculas nos organismos, só é possível devido à interação de catalisadores bioquímicos – Os enzimas (Salve,1997).

Os enzimas são maioritariamente proteínas, (Usman, 1996) com peso molecular elevado que pode oscilar entre 10 e 100 kD, compostas por carbono, hidrogénio, oxigénio, azoto e enxofre como qualquer cadeia polipeptídica. A sequência específica de resíduos de aminoácidos, ou estrutura primária é determinada pelo código genético (Fig. 2). Os resíduos de aminoácidos da cadeia linear unidos por ligações peptídicas, possibilitam a adoção de conformações essencialmente em hélice e folha pregueada  $\beta$ , comuns à estrutura secundária, ou ainda, arranjos tridimensionais característicos da *estrutura terciária*, fundamentais para a atividade biológica (Fig. 2). Assim, resíduos de aminoácidos muito distanciados na sequência primária podem encontrar-se próximos, devido aos enrolamentos, e formar deste modo regiões indispensáveis à atividade catalítica como o centro ativo onde o substrato é reconhecido pelo enzima. Por vezes, cada subunidade polipeptídica pode ligar-se a outros protómeros com estrutura terciária característica, originando dímeros, trímeros e oligómeros, arranjos estruturais usualmente descritos por *estrutura quaternária*, essenciais à modulação da atividade catalítica (Fig. 2) (Salve, 1997).

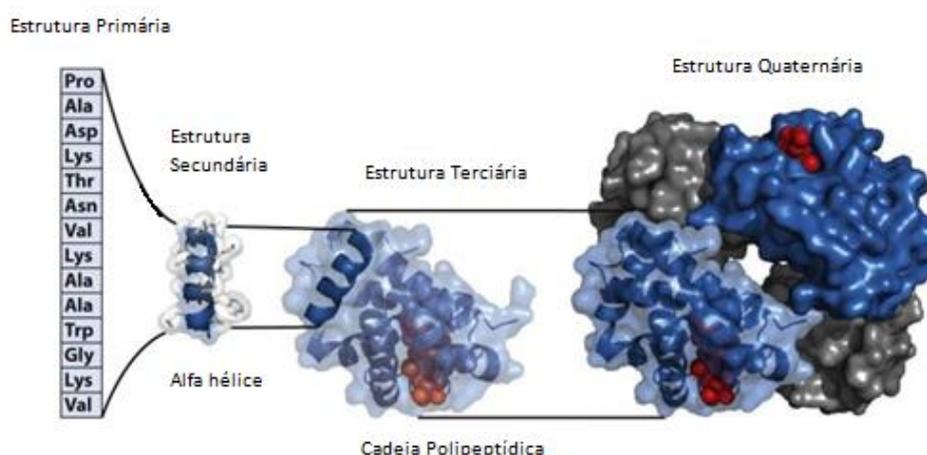


Fig. 2 - Níveis de organização estrutural das proteínas (adaptado de Pádua, 2005)

A atividade enzimática, depende da organização estrutural referida anteriormente, bem como de fatores limitantes como a temperatura, pH e concentração salina do meio (Moss, 2000). Como catalisadores biológicos, o seu papel principal é catalisar reações bioquímicas, ampliando de forma considerável ( $10^9 - 10^{20}x$ ) a velocidade das reações que ocorrem nos seres vivos (Campos, 1999). Segundo Salve (1997) os enzimas são eficazes em pequenas quantidades, não se consomem na reação, só afetam a velocidade com que se alcança o estado de equilíbrio e possuem maior especificidade para o substrato do que os catalisadores químicos habituais.

O substrato (S), após ser reconhecido pelo centro catalítico do enzima (E) forma complexo (s) intermediário (s) enzima-substrato (ES) que originam posteriormente o (s) produto (s) da reação (P) (Fig. 3). A energia de Gibbs necessária para a formação dos complexos intermediários, referida como energia de ativação é substancialmente inferior à despendida na formação do complexo ativado de conversão de substrato em produto sem mediação enzimática, pelo que o enzima acelera a velocidade da reação, minimizando essa barreira energética ao proporcionar outro percurso à reação. Essa propriedade tornou-se de grande importância para o desenvolvimento de técnicas laboratoriais (Coll, 1997).

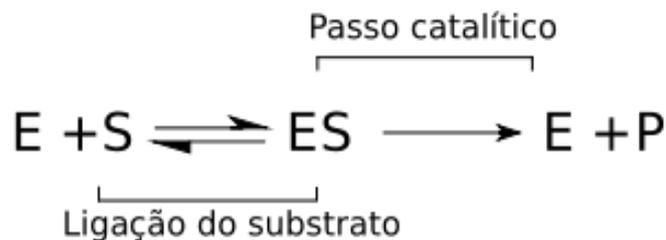


Fig. 3 – Formação do complexo enzima-substrato (adaptado de Moss, 2000)

A classificação dos enzimas, seguem as diretrizes da Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica (IUBMB). Denominam-se com as iniciais EC (Enzyme Commission) e quatro dígitos separados por pontos que representam de forma ordenada: a classe, subclasse, subsubclasse e o número de série específico na sua subsubclasse.

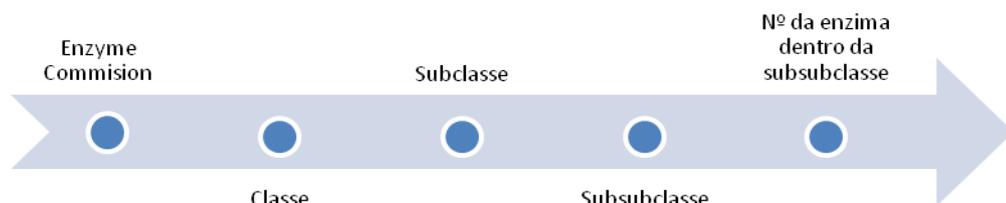


Fig. 4 – Classificação de enzimas - Comissão de enzimas da IUBMB (adaptado de McDonald, 2008)

Todos os enzimas pertencem a uma de seis classes possíveis, como oxidorreduzases (1), que catalisam reações de oxidação-redução de eletrões; transferases (2) envolvidas na transferência de grupos químicos, como amina ou fosfato; hidrólases (3), implicadas na rutura das ligações C-O, C-N, C-C, bem como outras com adição de água; liases (4) que hidrolisam ligações C-O, C-N e C-C por eliminação; isomerases (5) envolvidas em alterações geométricas ou estruturais dos substratos e ligases (6) que catalisam a união de dois substratos (Macdonald, 2008).

### 2.2.1. Características dos enzimas como marcadores

São vários os enzimas que servem de marcadores em reações, assim como outras Biomoléculas (Quadro 1). Existem vários fatores que fazem dos enzimas como escolha de eleição para compostos marcados, uma vez que estas são biológica e quimicamente a família de moléculas mais ativa (Walker, 1992).

**Quadro 1** – Enzimas utilizados como marcadores para Acs. e outras biomoléculas (adaptado de Walker, 1992)

Adenosina desaminase	Glucosidase
Fosfatase Alcalina	Hexoquinase
$\alpha$ – amilase	Peroxidase
Luciferina Bacteriana	Invertase
$\beta$ – amilase	Lisozima
$\beta$ – Galactosidase	Malato desidrogenase
Urease	Microperoxidase
$\beta$ – Lactamase	Glucose-6-Fosfato desidrogenase
Anidrase Carbónica	Fosfoglicomutase
Catalase	Fosfolipase C
Luciferase	Piruvato cinase
Glucose oxidase	Ribonuclease A

Os enzimas que servem de marcadores para os ensaios imunoenzimáticos, são a fosfatase alcalina, peroxidase de rábano, glicose-6-fosfato desidrogenase e  $\beta$ -galactosidase. Contudo, os enzimas utilizadas como marcadores, devem possuir requisitos para assegurar o sucesso da reação (Coll, 1997). Destacam-se a sua elevada atividade específica, na forma

conjugada e não conjugada; disponibilidade enquanto solúvel e purificada, a baixo custo e de qualidade reprodutível; elevada estabilidade das formas conjugadas e não conjugadas nas condições experimentais e de armazenamento; presença de grupos reativos para a sua ligação covalente; métodos de marcação simples e suaves; reconhecerem substratos não tóxicos, estáveis e de baixo custo que se convertam em cromóforos ou fluoróforos estáveis (Coll, 1997).

Nas técnicas desempenhadas profissionalmente, o enzima de eleição utilizado é a fosfatase alcalina. Este enzima tem um pH ótimo de 5,5 - 8,0 e é isolado de uma variedade de microrganismos e tecidos. Os seus conjugados, são muito estáveis mas os seus custos um pouco dispendiosos. Para evitar-se potenciais interferências em amostras biológicas, uma correta lavagem das fases sólidas (descritas adiante) é indispensável para o sucesso dos resultados (Walker, 1992). As propriedades dos enzimas e das moléculas a serem marcadas, podem ser consideradas como vantagens ou limitações. Embora esteja muito difundido o uso de enzimas para marcar anticorpos, requerem-se considerações de alguns aspetos da própria estrutura do anticorpo, para o sucesso do ensaio (Hens, 2010). Assim sendo, são vários os fatores importantes para a avaliação do desempenho e fiabilidade das técnicas, entre os quais: escolha do marcador mais adequado, anticorpos, reação entre os dois, e o método de detecção do ensaio.

### 2.3. Marcadores tumorais

Recebem o nome de marcadores tumorais as substâncias que se encontram no sangue, precedentes de uma célula neoplásica. Como será de esperar, esta última sintetiza compostos diferentes de uma célula normal, e daí o interesse do estudo destes mesmos compostos (Martinez, 2000). O que define uma célula tumoral é a perda de controlo no seu processo de crescimento e divisão, levando estes processos a crescimentos descoordenados e anárquicos, com o seu conseqüente crescimento no organismo. Dá-se deste modo, o crescimento de uma massa tumoral, que invade os tecidos circundantes que poderá romper membranas das suas estruturas. Se tal acontecer, prolifera e coloniza novos lugares, sendo este processo denominado de *metastização* (Salve, 2000). De uma forma sintética, poderá dizer-se que uma célula tumoral apresenta alterações na sua membrana (proteínas transmembranares, recetores, etc..), núcleo (oncogenes), e ciclo celular (divisão rápida) (Martinez, 2000).

É vasta a gama de marcadores tumorais conhecidos, podendo ser conseqüências metabólicas de uma carga tumoral; de anormalidades do sistema endócrino; marcadores enzimáticos específicos; antigénios tumorais ou alterações nos ácidos nucleicos (genes). Os marcadores são pois, uma característica que é medida e avaliada objetivamente e que nos oferece informação de interesse clínico sobre o estado da doença (Ballesta, 1993). A proteína de Bence Jones foi o primeiro marcador de tumor identificado (1846), seguida de hormonas, enzimas, isoenzimas e proteínas (Chan, 1997). No presente, procede-se também à análise cromossómica dos tumores. Sabe-se que a aplicação geral dos marcadores de tumores para monitorizar as neoplasias, não começou até a descoberta, em 1963, da  $\alpha$ -feto proteína (AFP) e do antigénio carcinoembrionário (CEA), em 1965. Com o progresso da genética molecular, tornou-se mais fácil a deteção de alterações cromossómicas ou produtos, incluindo o estudo de oncogenes e genes supressores, que levaram à rápida compreensão e ao uso de marcadores a nível molecular (Chan, 1997). Assim sendo, são várias as características a ter em conta quando se define um marcador tumoral (Filella, 2010). Inicialmente foi proposta uma tipificação que se baseava na origem destes biomarcadores que se subdividia em dois grandes grupos (Quadro 2), segundo a sua origem fosse o próprio tumor, ou produzido como resposta à presença do tumor.

**Quadro 2** – Classificação de marcadores tumorais em relação à sua origem (adaptado de Filella, 2010)

Origem	Tipo	Marcador
<b>Produzido por células tumorais</b>	Antigénios oncofetais	$\alpha$ -Feto proteína(AFP), Antígeno Carcino-Embrionário (CEA)
	Antigénios oncoplacentários	$\beta$ -HCG, Fosfatase alcalina placentária (PLAP), Glicoproteína específica da gravidez beta-1
	Mucinas	Antigénios de carcinoma 15-3, 19-9, 72-4
	Antigénios tissulares	Antigénios de carcinoma 125, Tiroglobulina
	Hormonas	Tiroglobulina, Calcitonina, Hormona adrenocorticotrófica(ACTH), Hormona Antidiurética (ADH)
	Enzimas	Enolase Neuro-Específica(NSE), Fosfatase ácida prostática(FAP), Metaloproteinases, Lactato desidrogenase, Fosfohexose Isomerase
	Oncoproteínas	Her-2-neu (Fator de crescimento epidermal Recetor-tipo 2)
	Proteínas específicas	Imunoglobulinas
	Citoqueratinas	Antigénio polipéptidico tecidual e específico (TPA, TPS)
<b>Produzido em resposta à presença do tumor</b>	Resposta do hospedeiro	Citocinas, $\beta$ -2-microglobulina, Proteínas de fase aguda

Segundo Salve (1997), um composto para ser considerado como marcador tumoral, deve ser produzido por uma célula neoplásica. Se se tratar de uma célula de origem embrionária que por algum motivo permaneceu “adormecida” no organismo de um adulto e num momento passou a estado ativo, estamos perante um marcador específico, já que nesse individuo não deve produzir-se a síntese de compostos puramente fetais. Temos como exemplo a gonadotropina coriônica (hCG) nos homens ou em mulheres não grávidas, e a  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) em pessoas sem alterações hepáticas.

A maior parte dos compostos são produzidos em organismos sãos, contudo o seu aumento significativo, indica uma proliferação celular e a presença de um tecido que perdeu a sua estrutura correspondente (Arderiu, 1998). Neste caso, o valor de referência estabelecido pelo laboratório clínico, deve ser estudado com rigor, devido à menor especificidade do marcador. De entre várias características, sabe-se que o marcador tumoral,

deve ser facilmente detetável no sangue, isto é, ser mensurável em laboratório clínico, e deve aparecer rapidamente em concentrações adequadas, as quais devem permitir perceber uma possível existência de um tumor não visível por outros meios (sensibilidade), e serem o reflexo do tamanho da massa tumoral (Filella, 2003). Deverá ser específico ao elevar-se apenas por causa da doença que se estuda e não por outras causas, e os seus níveis de deteção devem ser substancialmente diferentes em indivíduos sãos e em doenças benignas ou malignas. Por outras palavras, o valor diagnóstico de um marcador tumoral, vem definido pela sua sensibilidade (probabilidade de classificar corretamente um indivíduo com neoplasia), e especificidade (probabilidade de classificar corretamente um indivíduo na ausência da patologia) (Domínguez, 1993).

Resumidamente, em teoria um marcador tumoral ideal, deveria ser específico para um determinado tipo de tumor e sensível o bastante para detetar volumes tumorais antes da disseminação neoplásica. Deveria também, ter uma utilização de triagem e diagnóstico precoce. Além de ser detetado apenas na presença de neoplasia, deveria indicar o volume do tumor, a taxa de crescimento e resposta ao tratamento e progressão da doença (Filella, 2010).

### **2.3.1 Marcadores tumorais realizados em contexto profissional**

#### **2.3.1.1 - TPSA**

Designado por antigénio específico da próstata, é um dos poucos marcadores de malignidade organoespecíficos que pode ser usado para diagnosticar o cancro. É líder em homens com mais idade e estima-se que 2,6 milhões de novos casos são diagnosticados todos os anos (Bray, 2002). Quando detetado cedo (confinado ao órgão), é potencialmente curável por prostatectomia radical. Foi descoberto por Hara em 1971, mas em 1979, Wang e colaboradores purificaram uma proteína do tecido prostático e deram-lhe a designação habitual. É encontrado em tecidos prostáticos normais, benignos, hiperplásicos e malignos, mas não em outros tecidos humanos. Sabe-se que é uma glicoproteína de uma só cadeia com 7 % de glúcidos e é uma protease com serina da família calicreína (Chan, 2000). No sangue, encontra-se sobre duas formas: como componente importante formando complexo com um inibidor de proteinase ( $\alpha$ 1-antiquimotripsina – Mr de 80.000 a 90.000 daltons), e como componente secundário livre (Mr de 30.000 daltons).

Devido ao elevado tempo de semi-vida no soro (2 a 3 dias), pode ser necessário duas a três semanas para o que PSA soro retorne ao valor normal após alguns procedimentos, tais como biópsias ou toque rectal (Filella, 2011).

#### **2.3.1.2 - FPSA**

O PSA Livre (FPSA) é uma das formas imunorreativas do PSA. A sua percentagem no soro é descrita como significativamente mais elevada nos pacientes com hipertrofia benigna da próstata (HBP) do que nos pacientes com uma neoplasia da mesma (Filella, 2011).

O cálculo da percentagem de PSA livre, é determinado dividindo a concentração de PSA livre pela de PSA total, e o objeto da sua execução a nível laboratorial é medir a sua concentração para posterior cálculo da sua percentagem.

#### **2.3.1.3 - CA15-3**

Este marcador encontra-se frequentemente aumentado nos casos de cancro da mama, bem como em outros cancros, mas também em algumas patologias não cancerosas. A concentração de CA15-3 pode diminuir após tratamento e aumentar em caso de recaída, doença residual ou metástases (Filella, 2013). O teste laboratorial deste marcador, é utilizado no seguimento do tratamento dos pacientes com tumores malignos diagnosticados e no prognóstico da evolução da patologia. Uma diminuição da concentração do antigénio pode ser a indicação de uma boa resposta ao tratamento e, portanto, de um bom prognóstico. Um aumento constante da concentração é frequente como reflexo de uma evolução tumoral ou de uma má resposta ao tratamento (Chan, 2000). O CA 15-3 é detetado pelo anticorpo monoclonal murino (Mab, de *murine antidoby*) DF3 produzido contra um extrato, enriquecido em membranas, de um cancro de mama humano metastático para o fígado. Este anticorpo reconhece um epítipo dentro de uma sequência repetida de 20 aminoácidos do cerne peptídico (Chan, 2000).

#### **2.3.1.4 - CEA(s)**

O antigénio Carcino-embrionário é uma glicoproteína com o peso molecular de aproximadamente 200.000 daltons, que contém 45 a 55 % de glúcidos. É uma única cadeia peptídica, constituída por 641 resíduos de aminoácidos, com lisina na posição N-terminal. Este antigénio foi descrito pela primeira vez por Gold e Freedman em 1965.

É produzido pelas células durante a vida embrionária e fetal, e a sua produção é interrompida com o nascimento, isto é, pode detetar-se apenas uma taxa sérica muito reduzida em indivíduos sem qualquer patologia (Chan, 2000).

Segundo Chan (2000), o nível de CEA está elevado em vários tipos de neoplasias, tais como: colorretais (70 %), pulmonar (45 %), gástrico (50 %), mamário (40 %), pancreático (55 %), ovárico (25 %) e uterino (40 %). A taxa sérica de CEA diminui em situações oncológicas após o tratamento, e aumenta em caso de recaída, doença residual e metástases. Os testes efetuados em laboratório servem como testes complementares no prognóstico e no seguimento dos doentes com tumores malignos diagnosticados (Sturgeon, 2008). Este antigénio, permite apreciar a eficácia terapêutica; apreciar taxas pós operatórias que podem testemunhar o sucesso ou não de intervenção cirúrgica, assim como diagnosticar recidivas para possível decisão de nova intervenção.

#### **2.3.1.5 - CA 19-9**

Este antigénio glicídico é um glicolípido, e é um marcador para carcinoma, tanto colorretal quanto pancreático. A expressão do antigénio CA 19-9 requer o produto do gene Lewis, a 1,4-fucosiltransferase (Filella, 2013). Os pacientes que são genotipicamente Le<sup>a-b</sup> (cerca de 5 %) não expressam CA 19-9. O anticorpo monoclonal contra CA 19-9 foi desenvolvido a partir de uma linhagem celular de carcinoma de cólon humano, a SW-1116, por Koprowski e colaboradores. Os valores obtidos em laboratório podem diminuir, depois de um tratamento e aumentar no caso de uma recaída, doença residual e metástases. O CA 19-9 utiliza-se como teste complementar no prognóstico e no seguimento do tratamento dos pacientes com tumores malignos diagnosticados. Uma diminuição do valor deste marcador pode ser a indicação de uma boa resposta ao tratamento e, portanto, de um bom prognóstico (Filella, 2010). Um aumento constante de CA 19-9 é muitas vezes o reflexo de uma evolução tumoral e de uma má resposta ao tratamento.

#### **2.3.1.6 - CA 125**

O CA 125 é um marcador para carcinoma do ovário e endométrico. É uma glicoproteína de alto elevado peso molecular (> 200 kD) reconhecida pelo anticorpo monoclonal OC125. Este anticorpo foi desenvolvido por Blast e associados, usando uma linhagem celular (OVCA 433) de um paciente com cistadenocarcinoma papilar seroso do ovário (Chan, 2000). O CA 125 também se pode elevar em carcinomas não ováricos, tais como carcinomas

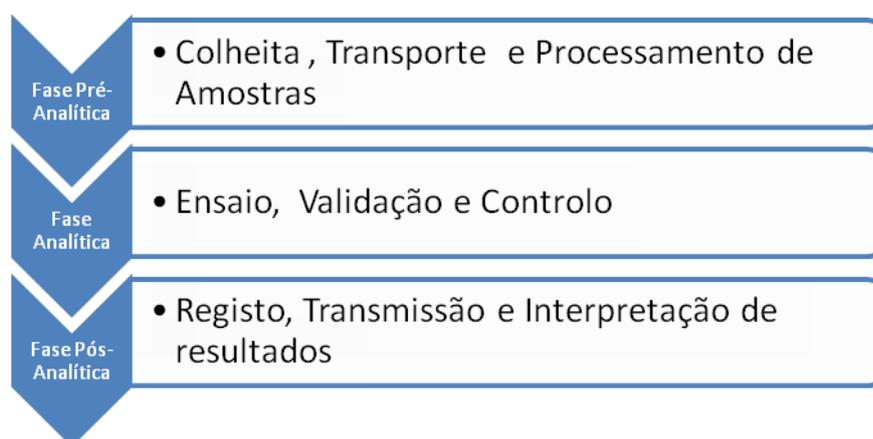
gastrointestinais, de mama, de pulmão e em outras patologias como diabetes, cirrose e também na gravidez (Filella, 2010). Este marcador pode ser útil na avaliação da condição da doença em pacientes com endometriose avançada, mas não é útil na triagem de neoplasia do ovário em populações assintomáticas. Não pode ser usado para diferenciar o cancro do ovário de outras malignidades.

## 2.4. Automatização em Laboratório - Ensaios Imunoquímicos

Presentemente um Laboratório Clínico, com o desenvolvimento da tecnologia, tornou-se num espaço onde se desenvolvem técnicas baseadas na automação. Este termo é definido pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*), como “a substituição do esforço de manipulação humana, facilitando a execução de um dado processo através de recursos mecânicos e instrumentais regulados pela retroinformação, de tal forma que o equipamento seja automonitorizável ou auto-ajustável”.

Associado à automatização, está envolvida uma dinâmica de trabalho, sequencial de várias fases individuais, nomeadamente: Pré-analítica, Analítica e Pós-analítica (Quadro 3).

Quadro 3 – Fases Analíticas (adaptado de Westgard, 2000)

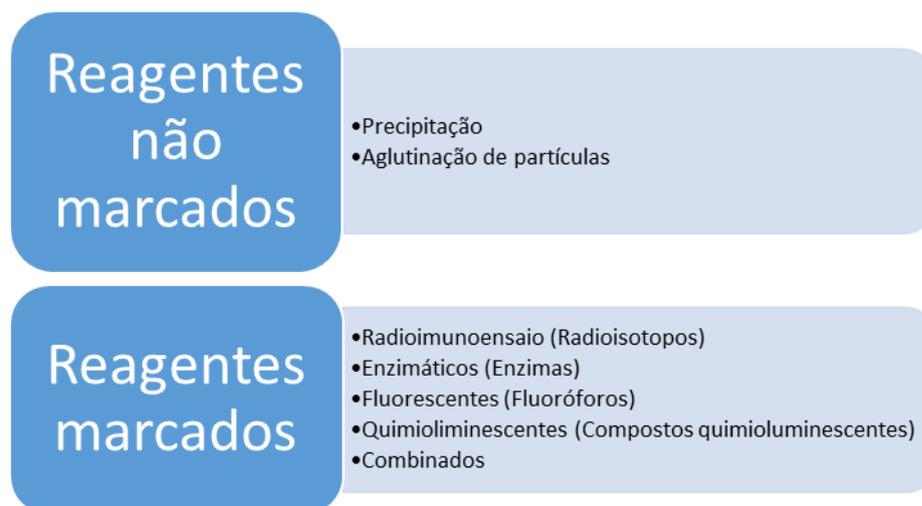


Toda esta dinâmica, é de grande responsabilidade uma vez que a falha de qualquer passo atrás descrito poderá afetar os resultados analíticos obtidos.

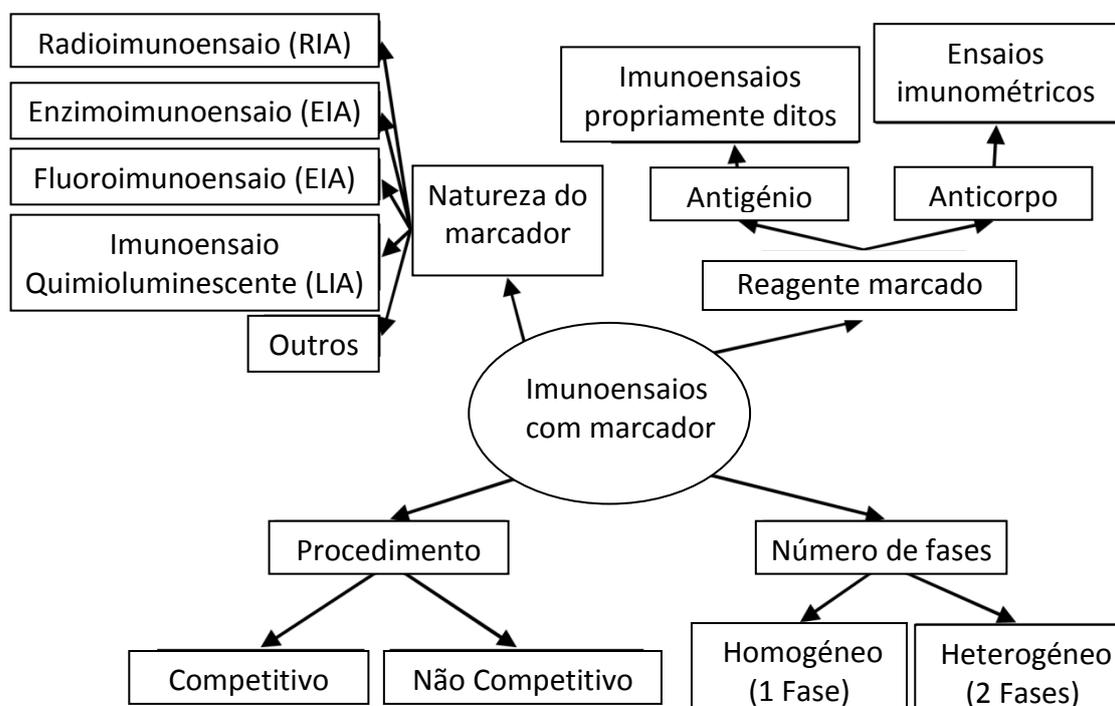
Os imunoenaios automatizáveis são muito utilizados atualmente em laboratório clínico. A sua ampla aceitação deve-se à sua capacidade de estabelecer métodos de determinação muito sensíveis e seletivos, assim como à sua versatilidade e campo de aplicação para determinados anticorpos e antigénios (Hens, 2010). Este tipo de ensaios, pode dividir-se em dois grupos: os que utilizam reagentes não marcados (diretos), ou os que utilizam reagentes com marcador (Quadro 4). Nos ensaios diretos, ocorre uma mudança de uma propriedade físico-química do meio, depois de uma reação do analito com o imunorreativo. O segundo grupo, bastante mais amplo, utiliza um marcador que sinaliza a reação imunoquímica. Este último, é um antigénio ou um anticorpo (segundo o tipo de imunoensaio), unido a uma substância marcadora, denominada “label”(L) em inglês, que exhibe uma propriedade como radioatividade, fluorescência ou atividade enzimática entre

outras, cuja medida se relaciona com a concentração do analito (Hens, 2010). Consoante a natureza do marcador o ensaio recebe nomes distintos tais como: radioimunoensaio (RIA), enzimoimunoensaio (EIA), fluorimunoensaio (FIA), imunoensaio quimioluminescente (LIA), etc. (Fig. 5).

**Quadro 4** - Classificação das Técnicas Imunoquímicas (adaptado de Hens, 2010)



Devido à sua versatilidade, e campo de aplicação muito superiores aos métodos diretos, explorar-se-á os ensaios com marcador (Fig. 5).



**Fig. 5** – Classificação de Imunoensaios com marcador (adaptado de Hens, 2010)

Os dois principais tipos de protocolos de reação usados, são chamados de competitivos (ensaios com reagentes limitados) e não competitivos (ensaios com excesso de reagente, em dois locais, ou em *sandwich*). Relativamente ao número de fases implicadas no processo encontramos ensaios homogéneos e heterogéneos (Hens, 2010). Consideram-se como *homogéneos* os processos que não necessitam de uma separação entre o anticorpo e o antigénio ligado e o livre marcado. Neste tipo de teste, a atividade do marcador ligado ao antigénio é modulada diretamente pela ligação do anticorpo, e a intensidade de modulação é proporcional à concentração do antigénio ou anticorpo a ser medido (Fig. 6).

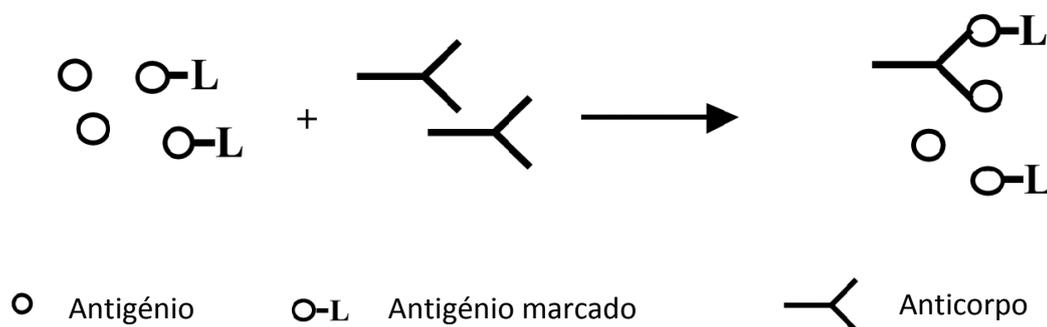


Fig. 6 – Esquema de Imunoensaios homogéneo (adaptado de Hens, 2010)

Já os considerados *heterogéneos*, têm maior versatilidade pois mediante formatos competitivos ou não competitivos (*Sandwich*), podem determinar-se haptenos, antigénios macromoleculares e anticorpos (Hens, 2010). Em qualquer tipo de ensaio heterogéneo (Quadro 5) requer-se a imobilização de algum componente em suporte sólido para conseguir-se a separação das frações conjugada e livre do marcador.

Quadro 5 – Tipos de ensaios heterogéneos e sua aplicabilidade (adaptado de Hens, 2010)

COMPETITIVOS	Direto com captura de antigénio	Determinação de antigénios (haptenos)
	Indireto com captura de anticorpo	
NÃO COMPETITIVOS (SANDWICH)	Direto com captura de antigénio	Determinação de antigénios (macromoléculas)
	Indireto com captura de antigénio	
	Antigénio imobilizado	Determinação de anticorpos
	Anticorpo imobilizado	

Os ensaios homogêneos são mais simples, rápidos e fáceis de serem automatizáveis que os heterogêneos, já que a determinação realiza-se na presença da matriz da amostra, podendo-se utilizar analisadores de bioquímica convencionais. Pelo contrário os ensaios heterogêneos são mais complexos, já que requerem pelo menos uma etapa de separação e uma instrumentação mais complexa (Hens, 2010).

#### **2.4.1 Enzimoimunoensaio (EIA)**

O termo Enzimoimunoensaio (EIA), abarca todos os tipos de Imunoensaios em que se mede a atividade de um enzima para a determinação de um analito que pode ser um antígeno ou um anticorpo. Surgiram nos anos 70 utilizando enzimas para obter marcadores, como alternativa aos isótopos radioativos utilizados em RIA (Hens, 2006). Esta modalidade de imunoensaio está muito bem estabelecida e desenvolvida em laboratório clínico.

As técnicas EIA dividem-se em dois grupos. O das técnicas EMIT e o grupo das técnicas ELISA. Enquanto nas técnicas EMIT a reação ocorre num meio líquido homogêneo e a separação entre reagentes ligado e não ligados não é satisfeita, nas técnicas ELISA, parte das reações ocorrem em meio sólido que também serve para separar os imunocomplexos dos reagentes não ligados (Morris, 1986). O método ELISA, é amplamente utilizado em laboratório e é um método Enzimoimunológico heterogêneo onde a formação do complexo não afeta a atividade catalítica do conjugado. Assim sendo, para poder quantificar o complexo formado é necessário separar do meio de reação o conjugado não unido (Hens, 2006). Embora sejam vários os métodos que o ELISA pode apresentar, explorar-se-á o método *ELISA não competitivo direto com captura de antígeno*, uma vez que é o utilizado como referência em contexto profissional para detecção de marcadores tumorais.

##### **2.4.1.1 ELISA não competitivo**

Este tipo de técnica, utiliza um dos componentes da reação absorvido inespecificamente à superfície de uma fase sólida. Esta fixação facilita a separação de reagentes marcados ligados e livres. O mais comum neste método, é adicionar uma alíquota de amostra ou do calibrador (contendo o antígeno a ser medido), a um anticorpo fixo a uma fase sólida, deixando-se que se ligue. Após a lavagem, um anticorpo marcado com enzima (diferente do anticorpo ligado) é adicionado, e forma ao ligar-se a outro determinante antigénico diferente, um “complexo em sandwich” de fase sólida- Ac-Ag-Ac-enzima (Kricka, 2000). Numa penúltima fase do processo, o excesso (não ligado) de anticorpo marcado, é

eliminado por lavagem, sendo seguidamente adicionado um substrato para o enzima. Desta forma o enzima catalisa a transformação do substrato em produto (s), cuja quantidade é proporcional à quantidade de antigénio na amostra (Fig. 7).

Esta técnica é portanto, aplicável somente antigénios que tenham mais do que um determinante antigénico (Coll, 1997).

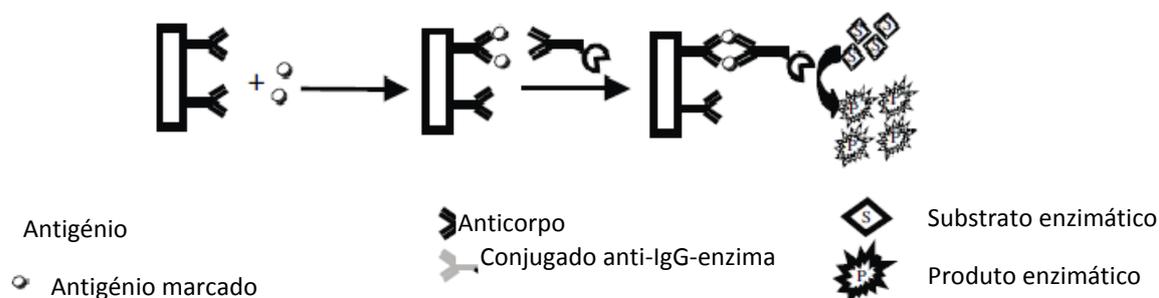


Fig. 7 - ELISA em *Sandwich* direto com captura de Ag (adaptado de Hans, 2006)

Segundo Scott (1990), este método tem sido posto em causa devido a possíveis interferências de outros componentes da amostra e variabilidade devida às condições do teste. Outro problema possível é a especificidade e seletividade do ELISA (Amado, 1999). No entanto, fatores como a sensibilidade do método ou a enorme quantidade de amostras que se podem manipular num dia, fazem desta técnica, uma técnica de referência em laboratórios.

Em contexto profissional, para a determinação do método apresentado, é utilizado o equipamento VIDAS, da casa comercial Biomerieux (Fig. 8).



Fig. 8 - Equipamento VIDAS – Biomerieux ([www.biomerieux-diagnostics.com](http://www.biomerieux-diagnostics.com))

É um sistema multiparamétrico, com cinco secções diferentes, tendo cada uma seis posições de teste, o que permite que diversos parâmetros sejam efetuados em simultâneo. Os seus reagentes estão pré-calibrados e as suas curvas de calibração são fornecidas sob forma de um código de barras para cada lote. Desta forma, só é necessário efetuar cada calibração e controlo de qualidade (QC), usando um calibrador e material de QC, incluído na embalagem do reagente. É um sistema automático, baseado na técnica ELFA – Ensaio de fluorescência ligado a enzima, uma técnica ELISA com sonda fluorescente. Esta metodologia é uma técnica ELISA em *sandwich* de elevada sensibilidade e especificidade para a detecção de antigénios, com leitura final de fluorescência proporcional a quantidade de antigénio presente na amostra.

Em 1979, Yolken e Stopa demonstraram que a sensibilidade da técnica ELISA poderia ser significativamente aumentada ao utilizar-se um substrato fluorogénico, em vez de um cromogénico, quantificando a fluorescência resultante num fluorómetro. O substrato vulgarmente utilizado é o 4-metilumbeliferil fosfato, o qual é cindido pela fosfatase alcalina em 4-metil-umbeliferona, uma substância fluorescente conhecida (Yolken,1982).

A execução técnica neste equipamento, obriga a fixação dos anticorpos no interior de uma fase sólida de reação, num cone SPR que atua também como pipeta (Fig. 9). Em cada fase da reação estes cones também aspiram e dispensam os reagentes. Este conceito original previne qualquer contaminação entre reagentes ou amostras. A ausência de tubos, seringas e agulhas reduz a manutenção do sistema ao mínimo. Os reagentes necessários à reação, estão dispostos num cartuxo identificado por código de barras que é automaticamente reconhecido pelo equipamento (Fig. 9). Este cartuxo é composto por dez poços cobertos com uma folha de alumínio selada. No seu primeiro poço coloca-se a amostra, e o último é uma que permite a leitura por fluorimetria. Uma vez depositada a amostra no poço destinado a esse efeito, o equipamento começa a sua análise, realizando as reações, lavagens e incubações necessárias até à leitura e emissão de resultados.



Fig. 9 - Cone (SPR) e Cartucho do sistema (www.biomerieux-diagnostics.com)

Resumidamente, o equipamento realiza a técnica ELFA automaticamente, e a reação processa-se de igual modo para os marcadores tumorais efetuados (Fig. 10):

Os antígenos presentes na amostra, fixam-se aos anticorpos situados na parede interna do cone; Os elementos livres (não fixados) são eliminados nas diferentes fases de lavagem; Os anticorpos marcados com fosfatase alcalina (contidos num dos poços do cartucho) são aspirados dentro do cone e fixam-se sobre o antígeno já unido aos anticorpos presentes no cone; Novas etapas de lavagem eliminam o conjugado não fixado; Um substrato, o 4-metil-umbeliferil fosfato, é introduzido no cone; O enzima que se encontra fixado nas paredes do cone, catalisa a transformação do substrato numa molécula fluorescente, a 4-metil-umbeliferona; A intensidade da fluorescência é medida através do sistema ótico do equipamento a um  $\lambda_{ex}$  de 370 nm, e um  $\lambda_{em}$  de 450 nm.

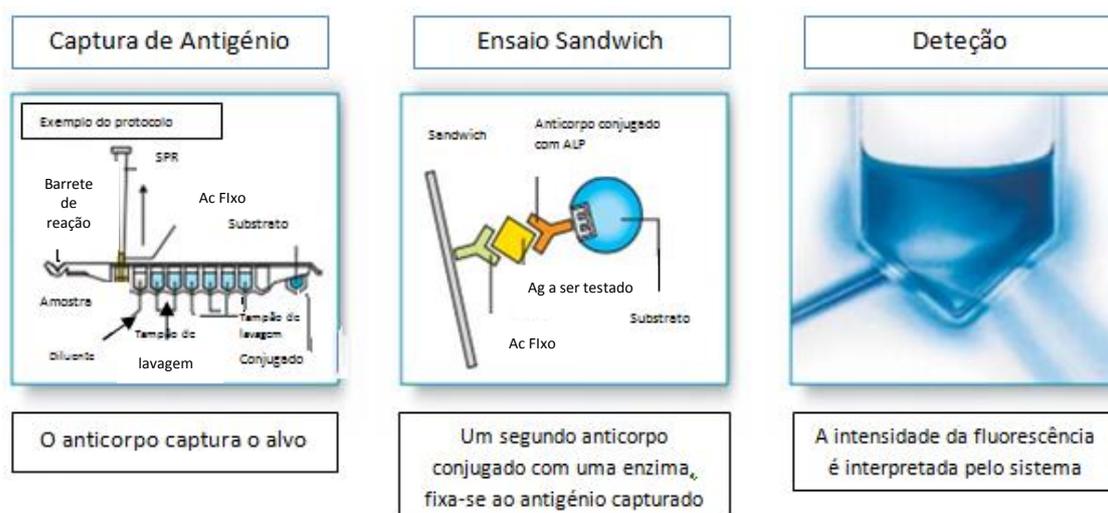


Fig. 10 - Esquema resumo da técnica ELFA (www.biomerieux-diagnostics.com)

### 2.4.1.2 Procedimentos

#### 2.4.1.2.1- TPSA

A amostra é aspirada e dispensada várias vezes no interior do cone SPR. Esta operação permite ao anticorpo monoclonal de rato anti-PSA fixado no cone capturar os determinantes antigénicos reativos presentes na amostra. Os componentes não fixados são eliminados por lavagem. O anticorpo monoclonal de rato anti-PSA conjugado com fosfatase alcalina é então incubado no cone onde se fixa com os determinantes antigénicos reativos. As etapas de lavagem eliminam em seguida o conjugado não fixado. Durante a etapa de revelação, o substrato 4-metil-umbeliferil fosfato é aspirado e dispensado pelo cone; o enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise deste substrato num produto, a 4-metil-umbeliferona, cuja fluorescência é proporcional à concentração do TPSA presente na amostra (Quadro 6).

Terminado o teste, os resultados são calculados automaticamente pelo aparelho por interpolação em curva de calibração previamente preparada e impressos os resultados.

**Quadro 6** - Descrição da TPSA ([www.biomerieux-diagnostics.com](http://www.biomerieux-diagnostics.com))

Poços	Reagentes
1	Poço de amostra
2-3-4-9	Poços vazios
5	Conjugado: Imunoglobulinas monoclonais de rato anti-PSA conjugados com fosfatase alcalina + azida sódica 0,9 g/l (400 µl)
6-7	Tampão de lavagem : Tris (0,05 mol/l), pH 7,4) + Tween (0,05%) + NaCl (0,4 mol/l) + azida sódica 0,9 g/l (600 µl)
8	Diluyente : Tris (0,1 mol/l) + NaCl (0,1 mol/l) + soro de vitela (5%) + azida sódica 0,9 g/l (400 µl)
10	Célula de leitura com o substrato 4-metil-umbeliferil fosfato (0,6 mmol/l) + dietanolamina (0,62 mol/l, pH 9,2) + azida sódica 1 g/l (300 µl)

#### 2.4.1.2.2 - FPSA

A amostra é aspirada e dispensada várias vezes no interior do cone SPR. Esta operação permite ao anticorpo monoclonal de rato anti-PSA específico para PSA livre, fixado no cone capturar os determinantes antigénicos reativos presentes na amostra. Os componentes não fixados são eliminados por lavagem. O anticorpo monoclonal de rato anti-PSA específico

para PSA livre conjugado com fosfatase alcalina é então incubado no cone onde se fixa com os determinantes antigénicos reativos. As etapas de lavagem eliminam em seguida o conjugado não fixado (Quadro 7).

Durante a etapa de revelação, o substrato 4-metil-umbeliferil fosfato é aspirado e dispensado pelo cone; o enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise deste substrato num produto, a 4-metil-umbeliferona, cuja fluorescência é proporcional à concentração do TPSA presente na amostra. Terminado o teste, os resultados são calculados automaticamente pelo aparelho por interpolação em curva de calibração previamente preparada e impressos os resultados.

**Quadro 7** - Descrição da FPSA ([www.biomerieux-diagnostics.com](http://www.biomerieux-diagnostics.com))

Poços	Reagentes
1	Poço de amostra
2-3-4	Poços vazios
5	Conjugado: Imunoglobulinas monoclonais de rato anti-PSA conjugadas com fosfatase alcalina + Tris (0,05 mol/l), pH 7,4) + NaCl (0,4 mol/l) + Tween (0,05%) + azida sódica 1,0g/l (600 µl)
6-7-9	Tampão de lavagem : Tris (0,05 mol/l), pH 7,4) + NaCl (0,4 mol/l) + Tween (0,05%) + azida sódica 0,9 g/l (600 µl)
8	Diluyente : Tris (0,1 mol/l) + NaCl (0,1 mol/l) + soro de novilho (5%) + azida sódica 0,9g/l (400 µl)
10	Célula de leitura com o substrato 4-metilumbeliferilfosfato (0,6 mmol/l) + dietanolamina (0,62 mol/l, pH 9,2) + azida sódica 1 g/l (300 µl)

#### 2.4.1.2.3 - CA15-3

A amostra é aspirada e dispensada várias vezes no interior do cone SPR. Esta operação permite ao anticorpo 115D8 fixado no cone, capturar os determinantes antigénicos reativos presentes na amostra. Os componentes não fixados são eliminados por lavagem. O anticorpo DF3 conjugado com fosfatase alcalina é então incubado no cone onde se fixa com os determinantes antigénicos DF3 reativos. As etapas de lavagem eliminam em seguida o conjugado não fixado. Durante a etapa de revelação, o substrato 4-metil-umbeliferil fosfato é aspirado e dispensado pelo cone; o enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise

deste substrato no produto 4-metil-umbeliferona, cuja fluorescência é proporcional à concentração do CA 15-3 presente na amostra (Quadro 8).

Terminado o teste, os resultados são calculados automaticamente pelo aparelho por interpolação em curva de calibração previamente preparada e impressos os resultados.

**Quadro 8** - Descrição da CA 15-3 ( [www.biomerieux-diagnostics.com](http://www.biomerieux-diagnostics.com))

Poços	Reagentes
1	Poço de amostra
2-3-4	Poços vazios
5	Conjugado: Anticorpo DF-3 conjugado com fosfatase alcalina + azida sódica 0,9g/l (400 µl)
6-7	Tampão de lavagem : Tris (0,1 mol/l),pH 7,4) + NaCl (0,1 mol/l) + Tween (0,05%)+ azida sódica 0,9 g/l (600 µl)
8	Diluyente : Tris (0,1 mol/l)+ NaCl (0,1 mol/l) + soro de novilho (5%) + azida sódica 0,9g/l (400 µl)
9	Tampão de lavagem : Tris (0,1 mol/l),pH 7,4) + NaCl (0,1 mol/l) + Tween (0,05%)+ azida sódica 0,9 g/l (600 µl)
10	Célula de leitura com substrato : 4-metil-umbeliferil fosfato (0,6 mmol/l) + dietanolamina (0,62 mol/l ,pH 9,2) + azida sódica 1 g/l (300 µl)

#### 2.4.1.2.4 - CEA(S)

O cone SPR é coberto por imunoglobulinas de rato anti-CEA no qual a amostra previamente diluída (automaticamente) irá incubar.

Uma primeira etapa de lavagem permite eliminar os componentes não fixados da amostra, e numa segunda etapa de incubação com anticorpos de cabra anti-CEA conjugados com fosfatase alcalina irão fixar-se ao cone (Quadro 9).

Segue-se outra etapa de lavagem que elimina o conjugado não fixado, e é incubado o substrato 4-metil-umbeliferil-fosfato que o enzima presente hidrolisa no produto 4-metil-umbeliferona.

Terminado o teste, os resultados são calculados automaticamente pelo aparelho em relação a uma curva de calibração memorizada e impressos os resultados.

**Quadro 9** - Descrição da CEA(S) ([www.biomerieux-diagnostics.com](http://www.biomerieux-diagnostics.com))

Poços	Reagentes
1	Poço de amostra
2-3-4	Poços vazios
5	Conjugado: Imunoglobolinas policlonais de cabra anti-CAE marcadas com fosfatase alcalina + azida sódica 1 g/l (400 µl)
6-7	Tampão de lavagem : Fosfato de sódio (0,01 mol/l), pH 7,4) + azida sódica 0,9 g/l (600 µl)
8	Diluyente : Tris (0,1 mol/l) + soro de vitela (5%) + azida sódica 1,0 g/l (400 µl)
9	Tampão de lavagem : dietanolamina (1,1 mol/l ,pH 9,8) + azida sódica 1,0 g/l (600 µl)
10	Cuvete de leitura com substrato : 4-metil-umbeliferil fosfato (0,6 mmol/l) + dietanolamina (0,62 mol/l ,pH 9,2) + azida sódica 1 g/l (300 µl)

#### 2.4.1.2.5 - CA19.9

A amostra é aspirada e dispensada várias vezes no interior do cone SPR. Esta operação permite ao anticorpo 1116-NS-19-9 fixado no cone capturar os determinantes antigénicos reativos presentes na amostra.

Os componentes não fixados são eliminados por lavagem. O anticorpo 1116-NS-19-9 conjugado com fosfatase alcalina é então incubado no cone onde se fixa com os determinantes antigénicos 1116-NS-19-9 reativos. As etapas de lavagem eliminam em seguida o conjugado não fixado (Quadro 10). Durante a etapa de revelação, o substrato 4-metil-umbeliferil fosfato é aspirado e dispensado pelo cone; o enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise deste substrato num produto 4-metil-umbeliferona cuja fluorescência é proporcional à concentração do CA 19-9 presente na amostra.

Terminado o teste, os resultados são calculados automaticamente pelo aparelho por interpolação de curva de calibração, previamente preparada e impressos os resultados.

**Quadro 10** - Descrição da CA 19-9 (www.biomerieux-diagnostics.com)

Poços	Reagentes
1	Poço de amostra
2-3-4	Poços vazios
5	Conjugado: Anticorpo 1116-NS-19-9 (rato) conjugado com fosfatase alcalina + azida sódica 0,9 g/l (400 µl)
6-7	Tampão de lavagem : Tris (0,05 mol/l), pH 7,4) + azida sódica 0,9 g/l (600 µl)
8	Diluyente : Fosfato de Potássio (0,05 mol/l) + soro de cavalo (5%) + azida sódica 0,9 g/l (400 µl)
9	Tampão de lavagem : Tris (0,05 mol/l ,pH 7,4) + azida sódica 0,9 g/l (600 µl)
10	Cuvete de leitura com substrato : 4-metil-umbeliferil fosfato (0,6 mmol/l) + dietanolamina (0,62 mol/l ,pH 9,2) + azida sódica 1 g/l (300 µl)

#### 2.4.1.2.6 - CA 125

A amostra é aspirada e dispensada várias vezes no interior do cone SPR. Esta operação permite ao anticorpo M11 fixado no cone capturar os determinantes antigénicos reativos presentes na amostra.

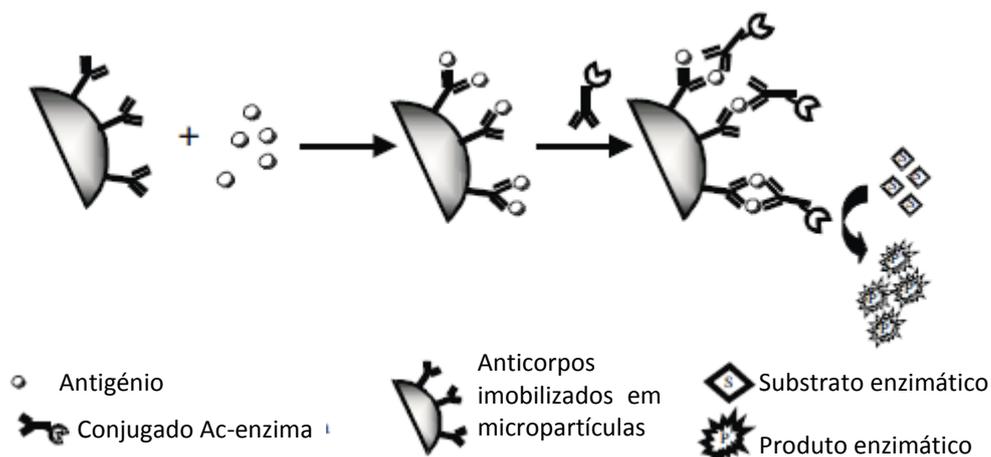
Os componentes não fixados são eliminados por lavagem. O anticorpo OC 125 conjugado com fosfatase alcalina é então incubado no cone onde se fixa com os determinantes antigénicos OC125 reativos. As etapas de lavagem eliminam em seguida o conjugado não fixado (Quadro 11). Durante a etapa de revelação, o substrato 4-metil-umbeliferil fosfato aspirado e dispensado pelo cone; o enzima do conjugado catalisa a reação de hidrólise deste substrato no produto 4-metil-umbeliferona cuja fluorescência é proporcional à concentração do CA 125 presente na amostra.

Terminado o teste, os resultados são calculados automaticamente pelo aparelho por interpolação em curva de calibração previamente preparada e impressos os resultados.

**Quadro 11** - Descrição da CA 125 (www.biomerieux-diagnostics.com)

Poços	Reagentes
1	Poço de amostra
2-3-4	Poços vazios
5	Conjugado: Anticorpo OC 125 conjugado com fosfatase alcalina + azida sódica 0,9 g/l (400 µl)
6-7	Tampão de lavagem : Tris (0,01 mol/l),pH 7,4) + Tween (0,05%)+ NaCl (0,4 mol/l) + azida sódica 0,9 g/l (600 µl)
8	Diluyente : Fosfato de Potássio (0,045 mol/l)+ soro de novilho (10%) + azida sódica 0,9 g/l (400 µl)
9	Tampão de lavagem : Dietanolamina (1,0 mol/l ,pH 9,8) + azida sódica 1,0 g/l (600 µl)
10	Cuvete de leitura com substrato : 4-metil-umbeliferil fosfato (0,6 mmol/l) + dietanolamina (0,62 mol/l ,pH 9,2) + azida sódica 1 g/l (300 µl)

Um outro conceito que utiliza o mesmo princípio laboratorial, é a tecnologia MEIA presente no sistema automático AxSym da casa comercial Abbott. Difere do equipamento apresentado anteriormente, pelo facto da fase sólida ser uma partícula de latex em substituição do cone SPR (Fig. 11).



**Fig. 11** - Esquema do Sistema MEIA (adaptado de Hans, 2006)

## 2.5. Controlo da Qualidade

Atendendo às políticas de qualidade nas organizações de saúde, garantir o rigor dos resultados que o Laboratório Clínico transmite, torna-se primordial no quotidiano dos profissionais envolvidos. Embora as pressões públicas e privadas para a contenção de custos acompanhem mais do que nunca o trabalho laboratorial, uma atitude de garantia de qualidade deve estar sempre presente.

O desempenho dos métodos analíticos pode ser monitorizado pela análise de amostras, cujas concentrações sejam conhecidas (Amostras de QC), e a comparação dos valores observados com os conhecidos. As quantidades conhecidas são geralmente representadas por uma faixa de valores aceitáveis, ou limites superior e inferior para o controlo da qualidade (limites de controlo). Assim sendo, quando os valores observados caem dentro dos limites de controlo, o analista pode assegurar-se que o método analítico está a funcionar corretamente (Westgard, 2010). Geralmente existem materiais de nível de controlo, normal e patológico, aos quais se associam um processo de interpretação estatística de resultados que devem ser avaliados com rigor (precisão e exatidão). É vasta a bibliografia sobre este assunto, que é encontrada nos livros de Westgard e Barry, mas que não será discutida neste relatório por não ser o objeto de estudo do mesmo. Define-se como Controlo da Qualidade Interno, o conjunto de procedimentos que na prática permitem avaliar a qualidade dos resultados das análises executadas. Quando o analista deteta erros, deve avaliar os mesmos e implementar soluções antes de prosseguir com o seu trabalho. O material que atualmente se usa para esse efeito, deve ter preferencialmente a mesma matriz que as amostras de teste de interesse; por exemplo, uma matriz de proteína pode ser melhor, quando o soro for o produto a analisar (Biorad, 2000). O material, deve ter boa estabilidade e de fácil uso (preparação e conservação). A maioria dos laboratórios, utilizam materiais de controlo que se encontram geralmente numa matriz líquida, para evitar erros de reconstituição, ou liofilizados, reconstituindo-se adicionando água ou uma solução diluente específica.

Através de controlo Interno, detetam-se erros fortuitos ou erros sistemáticos, que vão evidenciando ao longo do tempo a tendência de um desvio de resultados. Na primeira situação, normalmente o uso de um novo controlo (nova alíquota ou novo lote) elimina o erro, mas no segundo caso, o erro tem outro significado, pois significa em regra deterioração de regentes, controlos, ou algum problema inerente ao equipamento. Uma nova calibração

poderá resolver o assunto, mas se o caso persistir (mesmo com novo reagente), uma deslocação técnica da casa comercial do equipamento em questão, poderá ser necessária.

Uma outra forma de avaliar-se a qualidade dos resultados laboratoriais, consiste na prática do Controlo de Qualidade externo. Tal como o nome indica, os resultados são analisados por uma entidade externa, a qual fornece uma amostra “cega”. Esta avaliação externa da qualidade permite avaliar a exatidão das técnicas, e identificar erros sistemáticos ou tendências (Westgard, 2000). No âmbito desta prática, existem vários programas desenvolvidos por várias entidades. Entre as quais: INSA – Instituto Dr. Ricardo Jorge (Portugal); RIQAS – Randox (Irlanda), CAP – *College of American Pathologists* e UKNEQAS – *National External Quality Assessment Scheme* (Reino Unido).

De acordo com os resultados obtidos, estas entidades avaliam-nos e consoante o resultado poderá ser necessário tomar-se medidas corretivas ou preventivas.



## 2.6. Discussão/Conclusão

Os métodos imunoenzimáticos embora um pouco dispendiosos, estão amplamente difundidos em laboratórios clínicos e desempenham com grande eficácia a sua função, pois permitem a medição de concentração tanto de moléculas pequenas como de grande dimensão molecular como haptenos, antigénios e anticorpos. Geralmente as reações antigénio-anticorpo ocorrem segundo a lei de ação de massas, de forma que quanto maior é a concentração dos componentes, maior é a formação do complexo e vice-versa. Segundo Coll (1998), quando as concentrações dos componentes já são muito elevadas, dá-se um aumento adicional dessa mesma concentração e provoca uma menor formação de complexo. A este fenómeno denomina-se *efeito de prozona* e observa-se especialmente nos imunoensaios enzimáticos heterogéneos que utilizam uma fase sólida. Para evitar este efeito, deve diluir-se a amostra para assegurar a linearidade do método.

Embora a automatização dos EIA, tragam sem dúvida uma libertação da parte do analista no seu dia-a-dia, poderão levar a um esquecimento por parte do operador dos fundamentos teóricos, pelo que situações como a descrita anteriormente, podem tornar-se um problema. Outros fatores a ter em consideração na utilização destas técnicas, estão relacionados diretamente com a amostra utilizada, tais como: amostras hiperlipémicas, hemolisadas, ou ictéricas; presença de anticorpos heterófilos; presença de fatores reumatóides; competição entre anticorpos; e reação de antigénios endógenos (Coll, 1998). Os métodos imunoenzimáticos, são sem dúvida uma mais-valia para a monitorização de marcadores metabólicos de malignidade, mas, a maioria dos marcadores não preenche as características de sensibilidade e especificidade de forma a permitir diagnósticos precoces de neoplasias. Alguns marcadores porém, possuem sensibilidade e especificidade suficientes para que os possamos utilizar no acompanhamento da evolução da doença, no paciente previamente diagnosticado e submetido a algum tipo de tratamento, possibilitando o diagnóstico precoce da recorrência (Chan, 2000).

Os avanços da automatização, fazem prever o desenvolvimento de novos métodos imunoquímicos aplicados ao laboratório clínico, que melhorem em rapidez, custo e versatilidade face aos existentes atualmente (Hens, 2006). Por exemplo, a determinação de múltiplos marcadores tumorais num único ensaio, como alternativa ao uso de um ensaio para cada marcador. Tal facto, permitiria reduzir a duração, os volumes de amostra e

reagente assim como o custo da análise (Wu, 2007). Estando os métodos estudados amplamente disseminados, avanços nos conhecimentos de biologia molecular têm proporcionado um melhor entendimento dos mecanismos fundamentais que regulam a proliferação e a diferenciação celulares, bem como o desenvolvimento de metástases tumorais. (Chan, 2000) Assim sendo, e embora haja um campo vasto neste domínio a explorar, poderá num futuro próximo, alterar-se as práticas comuns laboratoriais na detecção de marcadores metabólicos de malignidade.

## 2.7. Bibliografia

- Arderiu F, Lacamba AMJC & Compãno, JMQ (1998) Bioquímica Clínica e Patologia Molecular. Ed. Reverté, S.A., Barcelona
- Buitrago, JMG, Ferreira EA, Rodriguez-Segade & Pozo, AS (1999) Bioquímica Clínica.: Mc Graw-Hill, Madrid.
- Campos, L (2005) Entender a Bioquímica, Escolar Editora, Lisboa
- Delvin, TM (2002) Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Eisenthal R & Danson MJ (1992) Enzyme Assays, a practical approach, IRL Press, Oxford.
- Filella X, Molina R, Ballesta AM (2003) Marcadores biológicos de câncer, 86-92.
- Filella X (2013), Estandarización y marcadores tumorales, Programa de Formación Continuada AEFA, Córdoba.
- Fuentes A, Castineras MJ, Querlató JM (1998) Bioquímica Clínica y Patologia Molecular, Ed. Reverté, Barcelona
- Hens AG, Caballos MP (2006) El enzimoimunoensayo en el Laboratorio Clínico, Programa de Formación Continuada AEFA, Córdoba.
- Hens AG, Caballos MP (2010) Actualización en Técnicas Inmunoquímicas de aplicación en el laboratorio clínico, Programa de Formación Continuada AEFA , Córdoba
- Krika LJ (2003) Clinical applications of chemiluminescence, Anal. Chim, 500, 279-286.
- Letonturier, P (2004). Guia Prático Climepsi de Imunologia Geral. Climepsi editores, Lisboa
- Martínez Salve ML, Menchero SP, Oliveras SA (2000) Laboratório de bioquímica, Interamericana Macgraw-hill, Madrid
- Pádua, M. (2005), Manual de apoio a Química Biológica; ESTESL, Lisboa
- Postuma-Trumpie GA, Korf J, Amerongen V (2009), Lateral flow (immuno)assay: its strengths weaknesses, opportunities and threats. A literature survey, Anal. Bioanal. Chem. 393, 569-582.
- Sinogas, C. (2012) Manual de apoio às sessões laboratoriais de Imunologia; Universidade de Évora
- Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ (2009) Screening and Prostate-Cancer Mortality in Randomized European Study. New Engl J Med, 360, 1320-1328.
- Stefan RI, van Staden JK, Aboul-Enein HY (2001), Immunosensors in clinical analysis, Fresenius Clin. Chim. 314, 1-26.

Sturgen CM, Duffy MJ, Stenmam UH (2008), National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast and ovarian cancers. *Clin Chem*, 54 : e11-e79

Suelter, C (1992). *Bioanalytical Applications of enzymes*, John Wiley & Sons Inc, vol.36, New York

Burtis C, Bruns D (2007) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, 6<sup>th</sup> edition, W.B.Saunders Company, USA.

Phillips, TM (1992) *Analytical techniques in immunochemistry*, Marcel Dekker, Inc., New York.

Wisdom, B (1976). Enzyme-Immunoassay, *Clinical Chemistry*, 22, 1243-1255.

Wu J, Fu Z, Yan F, Ju H (2007), Biomedical and clinical applications of immunoassay and immunosensors for tumor markers, *Trends Ana. Chem.* 26, 679-688.

Sites pesquisados na web:

- [www.anbioq.org](http://www.anbioq.org) Acesso a: 14/06/2013
- [www.biomerieux.com](http://www.biomerieux.com) Acesso a: 20/09/2013
- [www.b-on-pt](http://www.b-on-pt) Acesso a: 29/07/2013
- [www.iubmb.org](http://www.iubmb.org) Acesso a: 15/06/2013
- [www.nature.com](http://www.nature.com) Acesso a: 14/05/2013
- [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) Acesso a: 19/08/2013
- [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) Acesso a: 19/08/2013

### **3. Curriculum Vitae**



### **3.1. Introdução**

*“ Põe quanto és no mínimo que fazes ...”*

*Ricardo Reis*

Através deste Curriculum Vitae, procuro mostrar o meu percurso enquanto Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica na área Laboratorial, partilhando o meu percurso de académico e profissional.

### **3.2. Dados Bibliográficos**

**Nome:** Carlos David da Fonseca Valverde

**Data de nascimento:** 18 /11/1981

**Naturalidade:** África do Sul

**Filiação:** Carlos Alberto Valverde

Cecília Maria Simões Fonseca Valverde

**C.C:** 11892698

**Estado Civil:** Solteiro

**Residência:** Rua do Poço S/N, 2565-288 Freiria, Torres Vedras

**Telefone:** 911514135

**Cédula Profissional:** C-023811013

**Situação militar:** Resolvida

**Atividade Profissional Atual:**

Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica - Análises Clínicas e Saúde Pública

Local de Trabalho :

Unidade de Saúde da Ilha das Flores – Serviço de Patologia Clínica

Rua do Hospital – 9970 – Santa Cruz das Flores

Açores

### **3.3. Percurso Académico**

2000 – Concluiu o 12º ano de Escolaridade, Curso Científico Natural na Escola Secundária Ferreira Dias – Cacém, com a média de 14 valores (Anexo 1).

2003 – Concluiu o Bacharelato em Análises Clínicas e Saúde Pública na Escola Superior de Saúde Egas Moniz, com a média de 15 valores (Anexo 2).

2005 – Conclui o grau de Licenciado na Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa com a média de 15 valores (Anexo 3).

2009 - Conclui a pós graduação em Supervisão da Escola Superior de Saúde, do Instituto Politécnico de Leiria com a média de 16 valores (Anexo 4).

2009 – Conclui o III curso pós graduado de Microscopia Hematológica da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa com a média de 18 valores (Anexo 5).

2013 – A frequentar o Curso de Mestrado em Bioquímica pela Universidade de Évora

### **3.4. Formação Profissional de Base**

2000 – Ingressou no Curso de Análises Clínicas e Saúde Pública, da Carreira de Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica, na Escola Superior de Saúde Egas Moniz.

Constituição do curso:

1º ano – Unidades Curriculares de âmbito comum às Ciências da Saúde e unidades curriculares específicas de Análises Clínicas (aulas teóricas e práticas)

2º ano – Unidades Curriculares específicas da carreira (aulas teóricas e práticas)

3º ano – Estágio Laboratorial nas seguintes instituições

- Hospital Amadora-Sintra – Secção de Bioquímica

Secção de Microbiologia

Secção de Imunologia

Laboratório de Urgência

Módulo de Colheitas de Produtos Biológicos

- Hospital Pulido Valente – Estágio voluntário de 1 mês

Conclui o Bacharelato de Análises Clínicas e Saúde Pública com a média de 15 valores

2004/2005 – 4ºano – Unidades curriculares de carácter científico

Obteve o grau de Licenciado com a média de 15 valores

### **3.5. Formação Profissional Complementar**

#### **3.5.1. Ações de Formação**

##### **3.5.1.1. Curso de âmbito profissional com avaliação**

###### **2009**

- Concluiu com aproveitamento o curso de Pós-Graduação em Supervisão promovido pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de Leiria com a avaliação de 16 valores.
- Conclui com aproveitamento o III curso de Atualização de Microscopia Hematológica promovido pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, com a avaliação de 18 valores.

##### **3.5.1.2. Curso de âmbito profissional sem avaliação**

###### **2009**

- Curso de Alimentação Saudável e Diabetes (8 horas), promovido pela Abbott Laboratórios, a 16 de Junho em Lisboa (Anexo 10)

###### **2008**

- Curso de Genética (8 horas), no Congresso de Análises Clínicas e Saúde Pública na Figueira da Foz a 15 de Março (Anexo 9).

###### **2007**

- Curso de Formação ALERT EDIS, de 3 horas no Centro Hospitalar de Torres Vedras (Anexo 7)
- Curso de Formação ALERT EDIS, Perfil monitor do programa com 3 horas no Centro Hospitalar de Torres Vedras (Anexo 8)

###### **2006**

- Curso de Hematologia (8 horas), no Congresso de Análises Clínicas e Saúde Pública na Figueira da Foz a 24 de Março. (Anexo 6)

### **3.5.1.3. Curso de âmbito geral com avaliação**

#### **2009**

- Concluiu com classificação 5 (Numa escala de 0 a 5) o Curso de Formação Pedagógica de Formadores (promovido pela Geração de Futuro – Centro de Formação), com um total de 120 horas, passando a ser Formador do Instituto de Formação Profissional (Anexo 11 e 12).

### **3.5.1.4. Outras Formações em Serviço**

#### **2003 a 2010**

- Formação na ótica do utilizador para o equipamento Dimension RXL - Bioquímica (Anexo 13).

- Formação na ótica do utilizador para o equipamento Coulter LH750 - Hematologia

- Formação na ótica do utilizador para o equipamento Coulter GS - Hematologia

- Formação na ótica do utilizador para o equipamento HEMOCULTURAS - Microbiologia

- Formação na ótica do utilizador para o equipamento Architect – Imunologia

- Formação na ótica do utilizador para o equipamento CENTAUR – Imunologia (Anexo 14)

- Formação no Centro Hospitalar de Torres Vedras sobre D'Dimeros que decorreu a 19 de Março de 2009 (Anexo 15)

- Formação no Centro Hospitalar de Torres Vedras sobre Incêndios que decorreu a 10 de Março de 2009

#### **2011/2012**

- Unidade Curricular de Inglês para profissionais de Saúde na Escola Superior de Saúde da Cruz Vermelha Portuguesa, com 19 valores

- Curso de Sistemas de Imunoensaio, a 9 de Janeiro de 2012 na Siemens HealthCare (Anexo 16)

- Curso : Microbiology , a 14 de janeiro de 2012 na Siemens Healthcare (Anexo 17)

- Curso : Blood Gases Subscription Series Clinical Significance, a 17 de Janeiro de 2012 na Siemens HealthCare (Anexo 18)

- Curso : Autoanalisador Hematológico ADVIA 2120i, 2012 (Anexo 19)
- Curso de Dimension Integrated Chemistry System, a 27 de Janeiro de 2012 na Siemens HealthCare (Anexo 20)
- Curso de Controlo de Qualidade em sistemas de Hematologia, a 25 de janeiro de 2012 na Siemens HealthCare (Anexo 21)
- Curso de Hemostase, a 23 de Março de 2012 na Siemens Healthcare (Anexo 22)
- Curso de Stratus CS for Service Support Calibration and Methodology - Bioquímica , a 17 de Maio de 2012 na Siemens HealthCare (Anexo 23)
- Webinar “Lean : Bring Efficiency to your Lab”, a 27 de Setembro de 2012 na Siemens HealthCare (Anexo 24).

### **3.6. Jornadas, Congressos e outros eventos**

#### **2000**

- 25 e 26 de Novembro, participou no Congresso Técnico de Análises Clínicas e Saúde Pública – HUC (Anexo 25)

#### **2001**

- 10 e 11 de Março de 2001, participou nas VII Jornadas de Atualização de Análises Clínicas e Saúde Pública do Centro Hospitalar de Coimbra, realizado na Figueira da Foz (Anexo 26)

#### **2005**

- 16 a 20 de Maio, participou no II Congresso das Ciências e Tecnologias Laboratoriais e Intervenção comunitária, da ESTESL (Anexo 27)

#### **2006**

- 24 e 26 de Março , participou no Congresso de Análises Clínicas e Saúde Pública em Lisboa da APTAC (Anexo 28)

#### **2008**

- 15 e 16 de Março , participou no Congresso de Análises Clínicas e Saúde Pública no Porto da APTAC (Anexo 29)

- 25 e 26 de Abril, participou no 2º Congresso Científico da Associação Nacional de Laboratórios Clínicos em Vilamoura (Anexo 30)

- 14 e 15 de Novembro, participou no VI Congresso de Análises Clínicas e Saúde Pública da Sociedade de Bioanalistas Clínicos em Lisboa (Anexo 31)

#### **2009**

- 20 e 22 de Março , participou no Congresso de Análises Clínicas e Saúde Pública no Porto da APTAC (Anexo 32)

### **3.7. Carreira Profissional**

#### **2003**

- Colheitas de Sangue no Laboratório A. Reis Valle em Lisboa (Medicina do trabalho, entre outros postos de colheitas) (Anexo 33)

- A 1 de Junho inicia a sua atividade de Técnico de Análises Clínicas e Saúde Pública no Hospital CUF Infante Santo, num regime de total autonomia em horários noturnos assegurando todo o trabalho laboratorial sozinho.

Em paralelo trabalhou na Clínica de Santo António na Reboleira em colheitas de produtos biológicos. Cessa Funções a 1 de Junho de 2007. (Anexo 34)

- A 1 de Dezembro de 2003 é contratado pelo Centro Hospitalar de Torres Vedras em regime de horário completo (35 horas) integrando a escala de Urgência. Cessa Funções a 21 de Dezembro de 2011. (Anexo 35 e 36). Obtém classificação de Satisfaz Plenamente nas suas avaliações como funcionário da Instituição. (Anexos 37 e 38)

#### **2004**

- Inicia atividade como Técnico de Diagnóstico e Terapêutica no Hospital Amadora Sintra a 1 de Maio com o propósito de trabalhar no período de Verão por carência de técnicos. Cessa funções a 31 de Agosto (Anexo 39).

#### **2009/2010**

- Participa, como formador na Unidade Curricular de Química Clínica I com a Universidade Atlântica (Anexo 40)

- Participa como monitor de estágios em Hematologia, com a Universidade Atlântica (Anexos 41 e 42).

#### **2011/2012**

- Inicia a sua atividade como Especialista de Aplicações na Siemens Healthcare. Integra a equipa de Customer Care na qual acompanha e orienta clientes na resolução de problemas de Aplicações em equipamentos Laboratoriais (nas áreas de Bioquímica, Coagulação, Gasimetrias e Microbiologia).

- Aplica os seus conhecimentos de formador em todo o território de Portugal Continental e Regiões Autónomas (Anexo 43).

#### **2012/2013**

- Inicia atividade como Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica na Unidade de Saúde da Ilha das Flores na Região Autónoma dos Açores. Exerce funções sem tutela médica

integrando escala completa de 35 horas semanais. Integra o Conselho Técnico junto do Conselho de Administração, como representante das Tecnologias da Saúde (Anexo 44 e 45).

Possui neste momento a seguinte antiguidade

- . Na carreira – 10 anos e 4 meses
- . Na Função Pública – 9 anos
- . No Privado – 1 ano enquanto Especialista de Aplicações

### **3.8. Atividade Profissional**

#### Laboratório A. Reis Valle

- Colheitas de Sangue Venoso
- Colheitas de Produtos Microbiológicos

#### Laboratório Labdiagnóstica

- Colheitas de Sangue Venoso
- Colheitas de Produtos Microbiológicos
- Responsável de Posto de Colheitas ao Fim de semana

#### Laboratório Labdiagnóstica / Hospital CUF Infante Santo

Serviço de Patologia Clínica

Fez uma breve integração na equipa de rotina, após a qual integra a equipa de urgência.

Assegura o laboratório sozinho, durante os turnos da noite.

#### *Hematologia*

- Colheitas de Sangue Venoso a doentes internos e externos
- Colheitas de Sangue arterial (Gasimetrias)
- Execução de hemogramas por métodos manuais
- Execução de hemogramas por métodos automáticos
- Determinação de velocidade de sedimentação
- Determinação de TP, aPTT, Fibrinogénio, PDF's e D'Dimero
- Teste Células Falciformes
- Pesquisa de *Plasmodium* em Gota Espessa
- Determinações manuais e automáticas
- Execução, coloração e visualização de Esfregaços Sanguíneos

#### *Serologia*

- Determinação de técnicas serológicas

VDRL, Widall, Huddleson, DIG, RA teste, Rosa de Bengala, Paul-Bunell, Monotest,  
Pesquisa de sangue oculto nas Fezes, TASO, W.FÉLIX

### *Bioquímica*

- Centrifugação de amostras e separação de soro/plasma
- Doseamento no soro, plasma ou outros líquidos Biológicos de parâmetros usais na

#### Bioquímica por Química Seca

- Determinação de gases
- Preparação de Reagentes
- Calibração e controlo de qualidade das técnicas e manutenção de equipamentos
- Execução de Urinas tipo II (incluindo visualização de sedimentos)
- Gestão de Stocks

### *Imunologia*

Execução de  $\beta$  HCG e marcadores Tumorais

### *Microbiologia*

- Exame de LCR na sua totalidade, incluindo exame citoquímico, microbiológico e identificação serológica quando necessária.
- Execução de sementeiras dos produtos entrados
- Realização de esfregaços em lâmina, respetivas colorações e visualização microscópica
- Realização de Hemoculturas

### Hospital Amadora-Sintra

Colheitas de Sangue Venoso

Colheitas de Produtos Microbiológicos

### *Hematologia*

- Execução de hemogramas por métodos automáticos
- Determinação de velocidade de sedimentação
- Determinação de TP, aPTT, Fibrinogénio, PDF's e D´Dimeros
- Teste células Falciformes
- Pesquisa de *Plasmodium* em Gota Espessa
- Determinações manuais e automáticas
- Execução, coloração e visualização de Esfregaços Sanguíneos
- Determinação de Populações Linfocitárias

### Centro Hospitalar de Torres Vedras

#### Serviço de Patologia Clínica

Fez uma integração de 3 semanas na equipa de urgência, passando, a integrar a mesma. Trabalhou sem tutela médica aos fins-de-semana, feriados e noites. Assegurou o laboratório sozinho durante os últimos turnos referidos anteriormente.

#### *Hematologia*

- Colheitas de Sangue a doentes internos e externos
- Execução de hemogramas por métodos automáticos
- Determinação de velocidade de sedimentação
- Determinação de TP, aPTT, Fibrinogénio, PDF e D`Dimero
- Teste células Falciformes
- Determinações manuais e automáticas
- Execução, coloração e visualização de Esfregaços Sanguíneos
- Gestão de stock's quando assegura a rotina

#### *Serologia*

- Determinação de técnicas serológicas  
VDRL, Widall, Huddleson, DIG, RA teste, Rosa de Bengala, Monotest, Mycoplasma, W.FELIX, TASO
- Gestão de Stock's quando assegura a rotina

#### *Bioquímica*

- Centrifugação de amostras e separação de soro/plasma
- Doseamento no soro, plasma ou outros produtos Biológicos de parâmetros

#### Bioquímicos

- Determinação de várias Drogas de Abuso e Fármacos, no soro e na Urina
- Determinação de gasimetrias no aparelho ABL 500
- Preparação de Reagentes
- Calibração e controlo de qualidade das técnicas e manutenção de equipamentos
- Execução de Urinas tipo II (incluindo visualização de sedimentos)
- Gestão de Stock's quando assegura a rotina

### *Microbiologia*

- Exame de LCR na sua totalidade, incluindo exame citoquímico e identificação serológica quando necessária.
- Execução de sementeiras dos produtos entrados
- Realização de esfregaços em lâmina e respetivas colorações
- Realização de Hemoculturas
- Identificação e TSA de bactérias
- Técnicas Parasitológicas

### *Imunologia*

- Preparação de Reagentes
- Calibração e controlo de qualidade das técnicas e manutenção de equipamentos
- Gestão de Stocks quando assegura a rotina
- Execução de marcadores virais
- Execução de marcadores tumorais
- Doseamento de vitamina B12 e Ácido Fólico

### Siemens Healthcare

Integrou a equipa de Customer Care, sendo Especialista de Aplicações no domínio de Bioquímica Clínica, Hematologia e Microbiologia.

Inerente à sua profissão teve como funções, Configuração de equipamentos Laboratoriais, Resolução de problemas de Controlo de Qualidade, Calibrações e Resultados Analíticos.

### Unidade de Saúde de Santa Cruz das Flores

#### Serviço de Patologia Clínica

Fez uma integração de 2 semanas no serviço, passando a integrar o mesmo em escala completa de 35 Horas Semanais. Trabalha atualmente sem tutela médica.

Termina o seu período experimental (6 meses), com a nota de 19,16 valores na Função Pública.

Integra o conselho Técnico da Unidade de Saúde, o qual lhe confere responsabilidades definidas por lei entre as quais:

- Colaboração com o Conselho de Administração
- Atualização das Tecnologias presentes no Mercado
- Interação com diversas Instituições de forma a otimizar recursos Científicos e financeiros utilizados

Em Laboratório desempenha funções nas diferentes valências:

#### *Hematologia*

- Colheitas de Sangue a doentes internos e externos
- Execução de hemogramas por métodos automáticos
- Determinação de velocidade de sedimentação
- Determinação de TP, aPTT, Fibrinogénio, PDF e D´Dimero
- Determinações manuais e automáticas
- Execução, coloração e visualização de Esfregaços Sanguíneos
- Gestão de stock's

#### *Serologia*

- Determinação de técnicas serológicas  
VDRL, DIG, RA teste, Rosa de Bengala, Monotest, Mycoplasma,  
W.FELIX, TASO
- Gestão de Stock's quando assegura a rotina

#### *Bioquímica*

- Centrifugação de amostras e separação de soro/plasma
- Doseamento no soro, plasma ou outros produtos Biológicos de parâmetros Bioquímicos.
- Determinação de várias Drogas de Abuso e Fármacos, no soro e na Urina
- Preparação de Reagentes
- Calibração e controlo de qualidade das técnicas e manutenção de equipamentos
- Execução de Urinas tipo II (incluindo visualização de sedimentos)
- Gestão da qualidade do Laboratório

#### *Microbiologia*

- Execução de sementeiras dos produtos entrados

- Realização de esfregaços em lâmina e respetivas colorações
- Realização de Hemoculturas

### *Imunologia*

- Preparação de Reagentes
- Calibração e controlo de qualidade das técnicas e manutenção de equipamentos
- Gestão de Stocks quando assegura a rotina
- Execução de marcadores virais
- Execução de marcadores tumorais

### **3.9. Trabalhos Documentais Realizados**

- Estudo de investigação no âmbito de Saúde Pública. Os efeitos de TBT biocumulado na *Crassostra Angulata*. – Escola Superior de Saúde Egas Moniz (2003)
- Estudo de investigação no âmbito da Hematologia Clínica. – A variação do INR em pacientes Hipocoagulados através da comparação de dois métodos de colheita de sangue – Sistema de vácuo e seringa (2005).

### **3.10. Atividade de administração/Gestão**

#### **2009**

- Após conclusão dos estudos pós-graduados, são delegadas funções de Supervisão Pedagógica da Patologia Clínica no Centro Hospitalar de Torres Vedras. Torna-se o elo de ligação entre as diferentes instituições de ensino Universitário na área de Análises Clínicas e o referido Centro Hospitalar.
- Monitor de estágios na área profissional.

#### **2013**

Após nomeação junto do Conselho de Administração da Unidade de Saúde da Ilha das Flores, é nomeado representante das Tecnologias da Saúde

*Curriculum Vitae* para obtenção de grau de Mestre na área científica de Ciências da Vida

– Bioquímica, pela Universidade de Évora.

Torres Vedras, Setembro de 2013

## **Anexos**



**Anexo 1**



Anexo 2



## Certidão

MARIA MARGARIDA VIEIRA, Licenciada pelo Instituto Superior de Novas Profissões, na qualidade de Chefe de Secretaria da Escola Superior de Saúde Egas Moniz,

Certifica, em cumprimento do despacho exarado no requerimento que fica arquivado que o(a) aluno(a) **Carlos David da Fonseca Valverde**, nº 100193, natural de África do Sul, filho(a) de **Carlos Alberto Valverde** e de **Cecília Maria Simões da Fonseca Valverde**, concluiu nesta Escola o **Bacharelato em Análises Clínicas e de Saúde Pública**(Portaria nº915/99 de 14 de Outubro), em 14 de Agosto de 2003, com a classificação Final de **Quinze valores**, tendo obtido aprovação nas seguintes disciplinas:

Ano Lect.	Disciplina	Ano	Época Aval.	Data Final	Nota Final	Nota (Ext.)
2000-01	Bioquímica Geral	1	Época Normal	14-03-2001	14	Catorze Valores
2000-01	Química Geral	1	Época Recurso	24-09-2001	15	Quinze Valores
2000-01	Tecnologia Básica	1	Época Normal	28-02-2001	17	Dezasseis Valores
2000-01	Bioestatística	1	Época Normal	14-02-2001	18	Dezoito Valores
2000-01	Fisiologia I	1	Época Normal	15-02-2001	14	Catorze Valores
2000-01	Introdução à Profissão	1	Época Normal	28-02-2001	13	Treze Valores
2000-01	Psicologia	1	Época Normal	20-03-2001	16	Dezasseis Valores
2000-01	Fisiologia II	1	Época Normal	20-07-2001	13	Treze Valores
2000-01	Anatomia Humana	1	Época Normal	05-07-2001	12	Doze Valores
2000-01	Microbiologia Geral	1	Época Normal	20-07-2001	15	Quinze Valores
2000-01	Bioinformática	1	Época Normal	06-07-2001	17	Dezasseis Valores
2000-01	Biofísica	1	Época Normal	31-07-2001	16	Dezasseis Valores
2000-01	Química Aplicada I	1	Época Recurso	09-10-2001	15	Quinze Valores
2000-01	Saúde Pública	1	Época Normal	30-07-2001	15	Quinze Valores
2001-02	Química Clínica I	2	Época Normal	27-02-2002	13	Treze Valores
2001-02	Bacteriologia e Virologia	2	Época Normal	11-03-2002	15	Quinze Valores
2001-02	Hematologia	2	Época Normal	08-07-2002	15	Quinze Valores
2001-02	Tecnologia Instrumental	2	Época Normal	27-02-2002	14	Catorze Valores
2001-02	Análise de Água e Alimentos I	2	Época Normal	21-02-2002	16	Dezasseis Valores
2001-02	Histologia e Embriologia	2	Época Normal	19-02-2002	16	Dezasseis Valores
2001-02	Química Aplicada II	2	Época Normal	27-02-2002	14	Catorze Valores

*M. Vieira*

Campus Universitário  
Quinta da Granja · MONTE DE CAPARICA  
2829 - 511 CAPARICA  
Tel.: 21 294 67 00 - Fax: 21 294 68 32  
email: essem@iscss.pt



EGAS MONIZ

2001-02	Imunologia	2	Época Normal	25-02-2002	15	Quinze Valores
2001-02	Parasitologia	2	Época Normal	05-03-2002	17	Dezassete Valores
2001-02	Química Clínica II	2	Época Normal	16-07-2002	16	Dezasseis Valores
2001-02	Análise de Água e Alimentos II	2	Época Normal	31-07-2002	16	Dezasseis Valores
2001-02	Hemoterapia	2	Época Normal	18-07-2002	16	Dezasseis Valores
2001-02	Farmacotoxicologia	2	Época Normal	18-07-2002	15	Quinze Valores
2001-02	Genética	2	Época Normal	24-07-2002	13	Treze Valores
2001-02	Patologia Geral	2	Época Normal	30-07-2002	16	Dezasseis Valores
2002-03	Controlo de Qualidade e Amostragem	3	Época Normal	31-03-2003	18	Dezoito Valores
2002-03	Gestão e Tratamentos de Dados	3	Época Normal	13-03-2003	16	Dezasseis Valores
2002-03	Seminários I	3	Época Normal	23-07-2003	16	Dezasseis Valores
2002-03	Estágio I	3	Época Normal	22-07-2003	17	Dezassete Valores
2002-03	Seminários II	3	Época Normal	23-07-2003	19	Dezanove Valores
2002-03	Estágio II	3	Época Normal	14-08-2003	17	Dezassete Valores

A presente certidão, vai autenticada com o selo branco em uso nesta Escola.

Monte da Caparica, 27 de Julho de 2005

*Handwritten signature: H. S. Silva*

Anexo 3

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E DO ENSINO SUPERIOR



CERTIFICADO CURRICULAR

MARIA MANUELA MADUREIRA CARVALHO, Secretária da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, CERTIFICA, em cumprimento do despacho exarado em requerimento que fica arquivado nesta Secretaria, que nos livros competentes consta:

**a) CARLOS DAVID DA FONSECA VALVERDE**

Portador(a) do B.L. n.º 11892698 passado pelo Arquivo de Lisboa em 17-11-2004, aluno(a) da Escola, natural de África do Sul, filho(a) de Carlos Alberto Valverde e de Cecília Maria Simões da Fonseca Valverde realizou as unidades curriculares, abaixo discriminadas, do plano de estudos aprovado pela portaria n.º 1128/2000, de 20 de Janeiro, do 2º ciclo do curso bietápico de licenciatura em ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA

Unidades Curriculares	Classificação	Ano Lectivo de Aprovação
Investigação Aplicada em Análises Clínicas e Saúde Pública I	11	2004-05
Técnica Citológica em Análises Clínicas e Saúde Pública	14	2004-05
Biotechnologia Alimentar e Ambiental	16	2004-05
Toxicologia	16	2004-05
Farmacologia	15	2004-05
Psicologia da Saúde	11	2004-05
Química Biológica	11	2004-05
Investigação Aplicada em Análises Clínicas e Saúde Pública II	16	2004-05
Sociologia da Saúde	13	2004-05
Biologia Molecular	14	2004-05
Micologia/Virologia	10	2004-05
Patologia Forense	15	2004-05
Tecnologia em Parasitologia	17	2004-05
Instrumentação e Tecnologia	17	2004-05

a) Nome do(a) Aluno(a)

NOTA FINAL DE CURSO - (15) Quinze Valores



A SECRETÁRIA

Dr.ª Manuela Madureira

DATA: 24 de Fevereiro de 2006



Anexo 4



## CERTIDÃO

Elísio Augusto Gomes Pinto, Director da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de Leiria: -----

Certifica que **Carlos David da Fonseca Valverde**, filho/a de Carlos Alberto Valverde e de Cecília Maria Simões da Fonseca Valverde, nascido/a a 18 de Novembro de 1981, portador do Bilhete de Identidade n.º 11892698, obteve nesta Escola as seguintes classificações nas disciplinas abaixo discriminadas da **Pós-graduação em Supervisão**, com o plano de estudos constante do Despacho n.º 28488/2008 de 05 de Novembro publicado no Diário da República 2.ª Série, alterado pela Declaração de rectificação n.º 505/2009 de 18 de Fevereiro publicada no Diário da República 2.ª Série. -----

Disciplina	Sem.	Nota	Nota (extenso)	Créditos
<b>Ano: 1</b>				
Construção do conhecimento profissional	Anual	16	Dezasseis Valores	1
Comportamento e relação supervisiva	Anual	16	Dezasseis Valores	2
Estrutura e processo de supervisão	Anual	16	Dezasseis Valores	2
O supervisor	Anual	16	Dezasseis Valores	1
A supervisão e as condicionantes organizacionais	Anual	16	Dezasseis Valores	1
Processo de avaliação em supervisão	Anual	16	Dezasseis Valores	1
Questões éticas em supervisão	Anual	16	Dezasseis Valores	,5
Discussão de casos	Anual	16	Dezasseis Valores	1,5

Concluiu em 23 de Março de 2009 o curso de **Pós-graduação em Supervisão**, com a classificação de 16 (Dezasseis valores). -----

Consta dos documentos arquivados nestes serviços. -----

Passei a presente certidão que vai assinada e autenticada com o selo branco em uso nesta Escola. -----

Anexo 5

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



PARQUE DAS NAÇÕES

## CERTIFICADO

**JOÃO PEDRO CONCEIÇÃO SILVA**, Secretário da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, CERTIFICA, conforme consta no processo do respectivo curso arquivado nesta Escola, que:

*Carlos David da Fonseca Valverde*

Portador do Bilhete de Identidade n.º 11892698, passado pelos Serviços de Identificação Civil de Lisboa, em 22 de Junho de 2007, frequentou com aproveitamento, tendo obtido a classificação final de 18 valores, o **III Curso de Microscopia Hematológica**, realizado de 20 de Fevereiro a 19 de Junho de 2009, com a duração de 45 horas, correspondente a 3 ECTS, e o programa adiante discriminado:

### PROGRAMA

#### Módulo A

Patologia não neoplásica:

- a) Dos eritrócitos (anemias, poliglobulias secundárias)
- b) Dos leucócitos (anomalias do número e das funções)

#### Módulo B

Patologia neoplásica:

- a) Síndromas mielodisplásicas
- b) Síndromas mielo e linfo-proliferativas
- c) Leucemias agudas



DATA: 30 de Junho de 2009

O SECRETÁRIO  
*João Pedro Silva*  
Dr. João Pedro Silva

Anexo 6



# Certificado

A Associação Portuguesa dos Técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública (APTAC)  
certifica que

**CARLOS DAVID FONSECA VALVERDE**

frequentou o

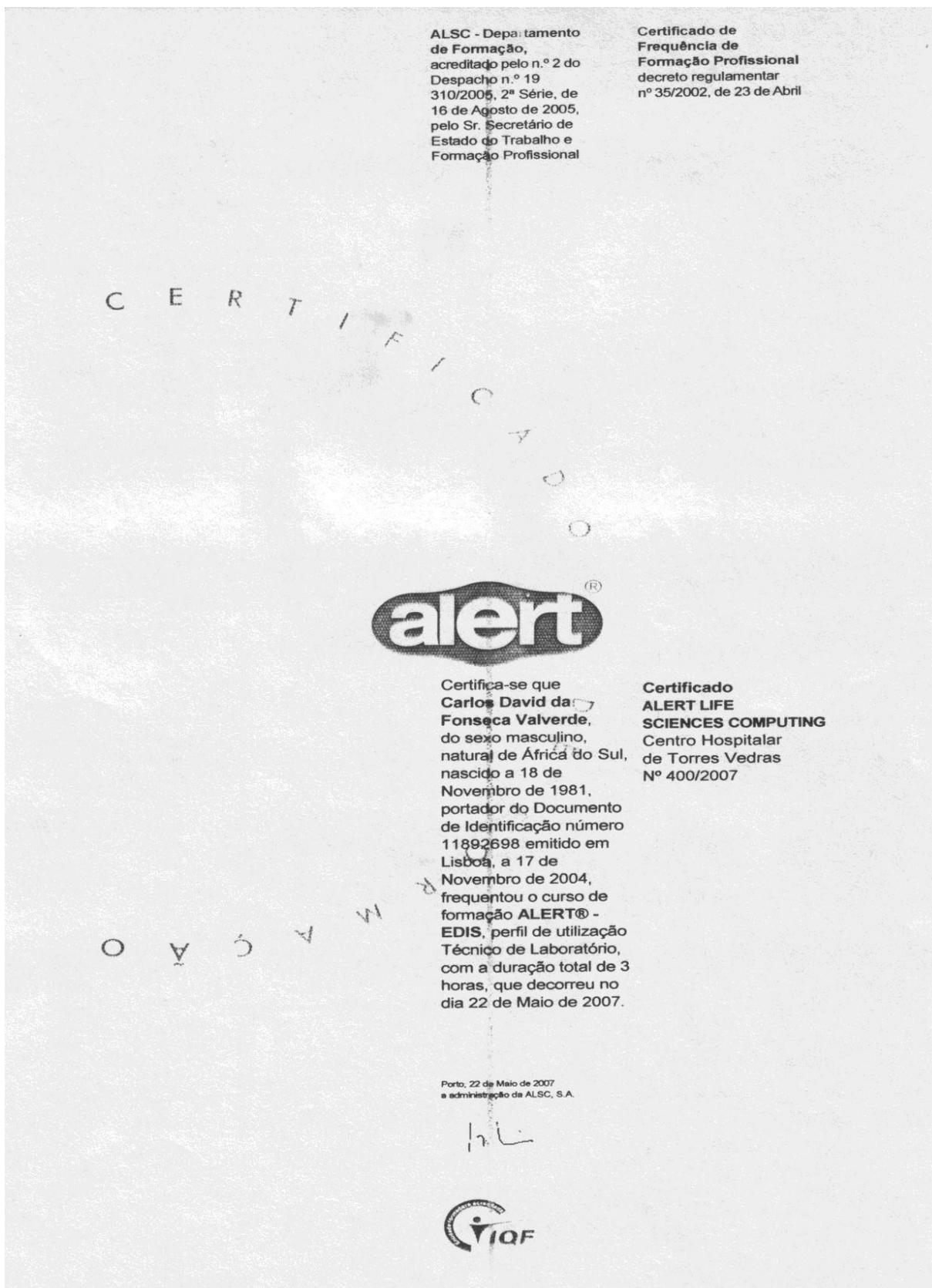
**CURSO DE HEMATOLOGIA**

que decorreu na Figueira da Foz, no dia 24 de Março de 2006.

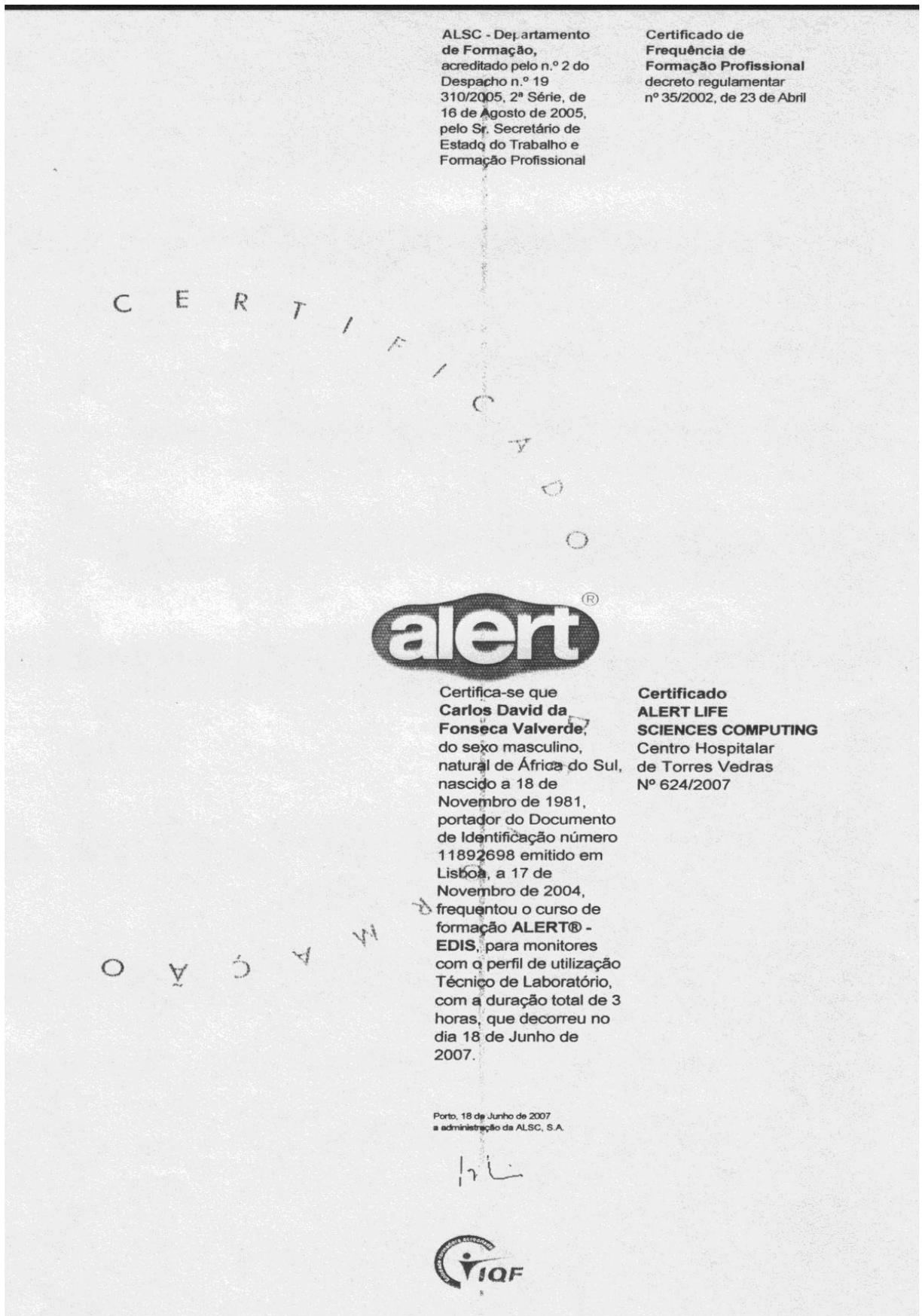
  
Paulo Sorfios  
Presidente do Congresso APTAC 2006

  
Maria Piedade Cruz Matos  
Presidente da APTAC

Anexo 7



Anexo 8



Anexo 9



CERTIFICADO

Congresso de Análises Clínicas  
e Saúde Pública  
APTAC 2008

A Associação Portuguesa dos Técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública (APTAC) certifica que,  
*Carlos David Valverde*

frequentou o

Curso de Genética

*Fernando Zorro*  
Presidente do Congresso APTAC 2008

*Teresa Gada*  
Presidente da APTAC



Anexo 10



Anexo 11



Anexo 12



 **MINISTÉRIO DO TRABALHO E DA SOLIDARIEDADE SOCIAL**  
**INSTITUTO DE EMPREGO E FORMAÇÃO PROFISSIONAL, I. P.**

 **CERTIFICADO**  
**DE APTIDÃO PROFISSIONAL**

[Decretos Regulamentares n.º 26/97, de 18 de Junho e n.º 66/94, de 18 de Novembro]

Certifica-se que **CARLOS DAVID DA FONSECA VALVERDE** nascido em 1981.11.18, natural de África Do Sul, portador de Bilhete de Identidade n.º 11892698 emitido pelo Arquivo de Identificação de Lisboa, em 2007.06.22, possui competências pedagógicas para exercer a profissão de **FORMADOR (M/F)**, conforme as que são definidas no respectivo perfil profissional.



Instituto do Emprego e Formação Profissional, entidade certificadora competente ao abrigo Decretos Regulamentares 66/94, de 18 de Novembro e 26/97 de 18 de Junho.

Lisboa, 14 de Janeiro de 2009

O Subdelegado Regional

  
(Vítor Hugo Coelho)

Certificado n.º EDF 493036/2009 DL

Válido até 2014.01.14

Anexo 13



# Certificado de Presença

Dade Behring

David Valverde

Certifica que recebeu formação na  
óptica do utilizador para o  
equipamento

**Dimension® RXL**

**14 Setembro 2004**

*Anabela Jorge*

Especialista de  
Aplicações

DADE BEHRING

Anexo 14



Anexo 15



Declaração de Formação em Serviço - Formando

Nº mec	81911	
Nome	Carlos David da Fonseca Valverde	TOTAL
Serviço	Patologia Clínica	
Agrupamento Profiss	Pess. TDT	4 horas

Data	Designação	Duração(H)	Serviço Organizador
10-03-2009	"Combate a Incêndios"	2	SSO/CCEI
19-03-2009	D-Dimeros e Marcadores Cardíacos	2	Patologia Clínica

Promovido pelo Centro de Formação(1) do Centro Hospitalar de Torres Vedras.

Torres Vedras, quarta-feira, 16 de Setembro de 2009

O CENTRO DE FORMAÇÃO



O Responsável

(1) Entidade Acreditada por Despacho n.º 13.019/98 de 29-07 pela Ministra da Saúde

Rua Dr. Aurélio Ricardo Belo . 2560-324 TORRES VEDRAS  
TELEFONE. 261 319 300 | FAX. 261 319 299 | WEB. www.hospitaltorresvedras.com

CHTV - Mod. 68 - IOR 80 gr. Laser - Torrespen-Gráfica, Lda - T.Vedras

Anexo 16

**ACHIEVEMENT**

**SIEMENS**

*This is to certify*

**Carlos David Valverde**

*has completed a course of instruction on*

**IMMULITE® 2000 XPi Immunoassay System  
Quality Control Mentor Checklist**

**January 9, 2012**

*Farogh Nazari*

Farogh Nazari, PhD, MBA, MLS/ASCP/CM



Anexo 17

# ACHIEVEMENT

**SIEMENS**

*This is to certify*

**Carlos David Valverde**

*has completed a course of instruction on*

**Microbiology Overview**

**January 14, 2012**

*Faregh Nazari*

Faregh Nazari, PhD, CLS (MCA)



Anexo 18

**ACHIEVEMENT**

**SIEMENS**

*This is to certify*

**Carlos David Valverde**

*has completed a course of instruction on*

**Blood Gases Subscription Series  
Clinical Significance**

**January 17, 2012**

*Farogh Nazari*

Farogh Nazari, PhD, MBA, MLSC(PT)CM



Anexo 19



Anexo 20



Anexo 21

**ACHIEVEMENT**

**SIEMENS**

*This is to certify*

**Carlos David Valverde**

*has completed a course of instruction on*

**Introduction to Quality Control  
What is it and How does it work?**

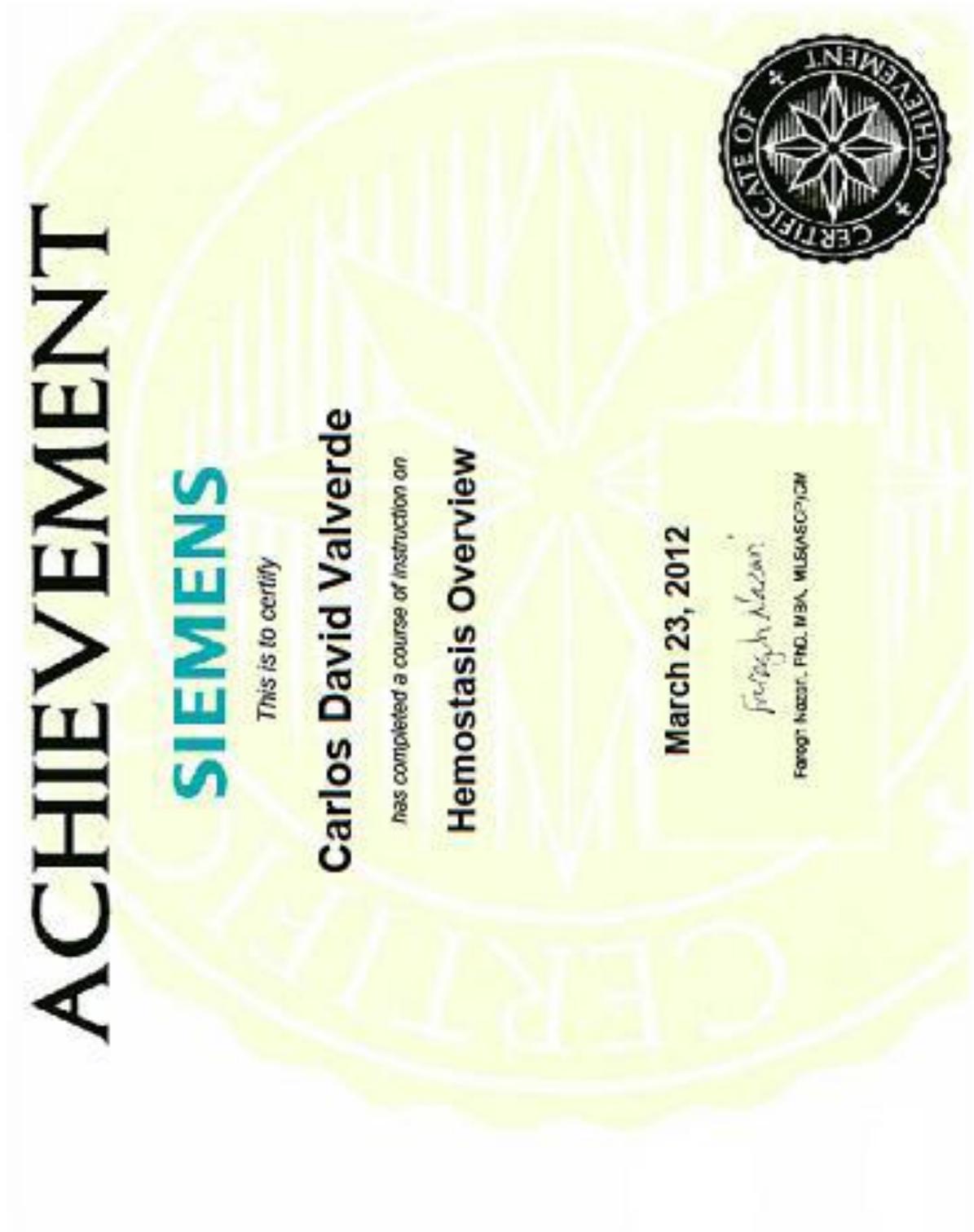
**January 31, 2012**

*Faregh Nazari*

Faregh Nazari, PhD, MBA, WILS/ANEP/ICM



Anexo 22



Anexo 23

**ACHIEVEMENT**

**SIEMENS**

*This is to certify*

**Carlos David Valverde**

*has completed a course of instruction on*

**Stratus® CS for Service Support  
Calibration and Methodology**

**May 17, 2012**

*Farogh Nazari*

Farogh Nazari, Ph.D., MBA, WILSONSON/CIAM



Anexo 24

**Certificate**

Learn Webinar

**CARLOS VALVERDE**

This certificate of attendance certifies that Carlos Valverde attended the webinar "Bring Efficiency to Your Lab". This material and certificate will assist in the Lab productivity and assist in the application of laboratory setting to achieve process, IT, programs and cost reduction. Webinar objectives include:

- Review the process of Lab
- Discuss all methods such as all jobs, patient and Lab system mapping.
- Discuss all lab-wide aspects of how can laboratory used the workflow management and automation to reduce the overall laboratory cost.

Webinar, September 27, 2012

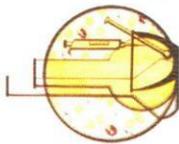
*James G. Donnelly*

James Donnelly, Ph.D., DABCO, RCMP, FRC  
Chief of Medical and Clinical Affairs  
Siemens Healthineers Diagnostics Inc.

www.siemens-healthineers.com

**SIEMENS**

Anexo 25



CONGRESSO TÉCNICO  
DE ANÁLISES CLÍNICAS  
E SAÚDE PÚBLICA HUC  
Certificação pelo Serviço de Formação e Aperfeiçoamento Profissional das H.U.C.  
25 e 26 de Novembro de 2000



S.F.A.P.

# CERTIFICADO

Certifica-se que

**Carlos David da Fonseca Valverde**

esteve presente, como **PARTICIPANTE**, no **Congresso Técnico de Análises Clínicas e Saúde Pública - HUC 2000**, nos dias 25 e 26 de Novembro de 2000.



A Comissão Organizadora

Anexo 26

# Certificado

Conferido a *Carlos David da Fonseca Valverde*.....  
pela participação nas VII Jornadas de Actualização de Análises Clínicas  
e Saúde Pública do Centro Hospitalar de Coimbra, realizadas a 10 e 11  
de Março de 2001, na Figueira da Foz, na qualidade de **PARTICIPANTE**.....

.....  
O Director do C. H. C.

O Secretariado das Jornadas

*Fredolice de*

*CA*

*[Handwritten Signature]*

*Dr. Décio de Sousa*

Anexo 27



## CERTIFICADO

*Carlos David da Fonseca Valverde*

participou no II Congresso do Departamento das Ciências e Tecnologias Laboratoriais e Intervenção Comunitária, da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa.

O II Congresso decorreu em Lisboa, na ESTeSL – Parque das Nações, de 16 a 20 de Maio de 2005.  
Lisboa, 20 de Maio de 2005

O Presidente do Conselho Directivo

Prof. Coordenador Manuel Correia

A Directora do Departamento das Ciências e Tecnologias Laboratoriais e Intervenção Comunitária

Prof. Coordenadora Anabela Graça

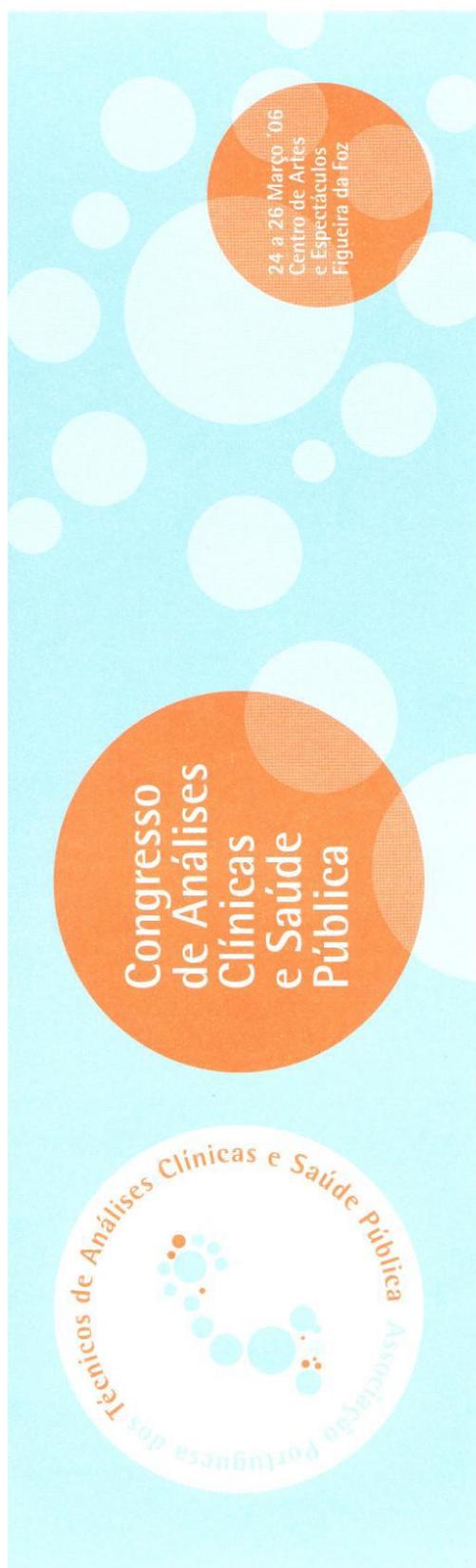


Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa



Instituto Politécnico de Lisboa

Anexo 28



# Certificado

A Associação Portuguesa dos Técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública (APTAC)  
certifica que

**CARLOS DAVID FONSECA VALVERDE**

frequentou o

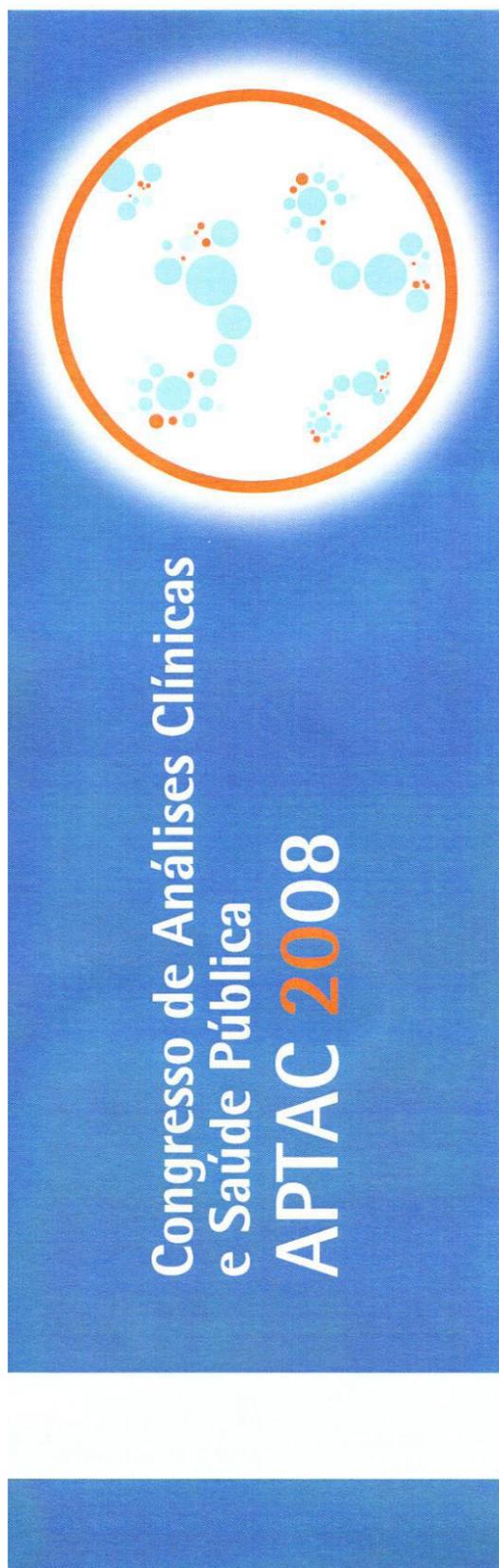
**Congresso de Análises Clínicas e Saúde Pública  
APTAC 2006**

que decorreu na Figueira da Foz, de 24 a 26 de Março de 2006.

  
Paulo Sarifos  
Presidente do Congresso APTAC 2006

  
Maria Piedade Cruz Matos  
Presidente da APTAC

Anexo 29



CERTIFICADO

A Associação Portuguesa dos Técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública (APTAC) certifica que,  
*Carlos David Valverde*

Participou no **Congresso de Análises Clínicas e Saúde Pública APTAC 2008**

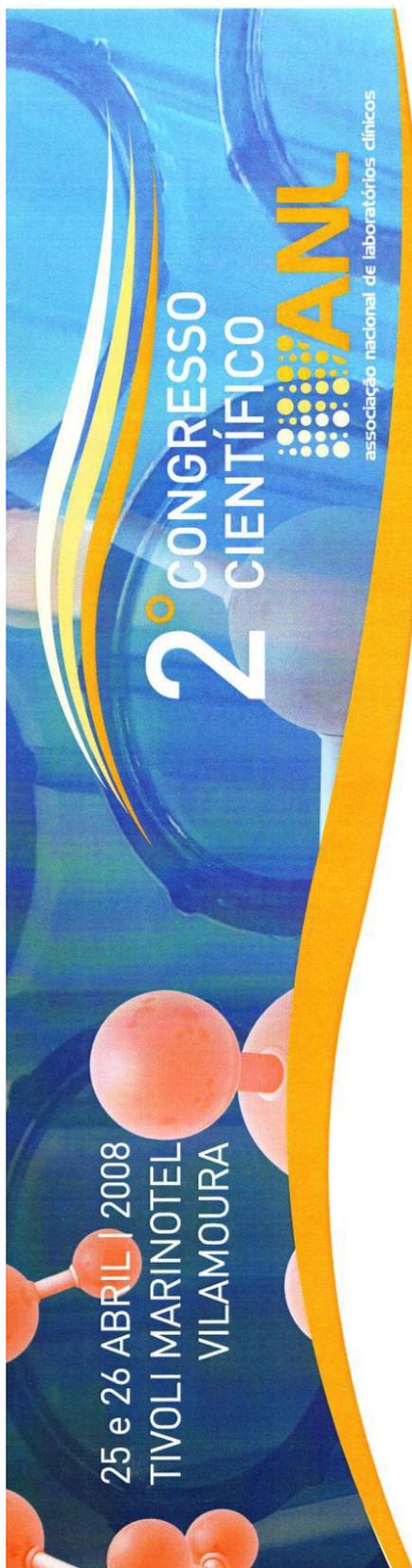
que decorreu em Lisboa a 15 e 16 de Março de 2008.



*Fernando Zorro*  
Presidente do Congresso APTAC 2008

*Teresa Geada*  
Presidente da APTAC

Anexo 30



Certifica-se que David Valverde

participou nas sessões do 2º Congresso Científico da ANL

que se realizou nos dias 25 e 26 de Abril de 2008 no Tivoli Marinotel em Vilamoura.

Vilamoura, 26 de Abril de 2008

O Presidente da Comissão Organizadora

Germano de Sousa

Anexo 31



Anexo 32



## Anexo 33



Rua Tomás Ribeiro, 95  
1050-227 LISBOA  
Telef.: 213 173 630 - Fax: 213 173 654

C.R.C. de Lisboa sob o nº 787  
Capital Social 612.500 €  
Contribuinte: 501 062 254

[www.a-reisvalelda.pt](http://www.a-reisvalelda.pt)

## DECLARAÇÃO

Declara-se para os devidos efeitos que o Sr. Carlos David da Fonseca Valverde, contribuinte nº 220.453.136, trabalhou nesta empresa em regime de TCO durante o mês de Julho de 2003, com a categoria profissional de Técnico de Análises Clínicas.

A Gerência,  
A. REIS VALLE, LDA.  
LABORATÓRIO DE ANÁLISES  
CLÍNICAS E HORMONAIS  
Contr. 501 062 254  
Rua Tomás Ribeiro, 95-2.º  
Telef. 21 317 36 30  
1050-227 LISBOA

Lisboa, 19 de Janeiro de 2010

Anexo 34



Centro de medicina laboratorial

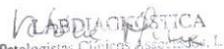
**DECLARAÇÃO**

Declaramos para os devidos efeitos e a pedido do interessado, que

**CARLOS DAVID DA FONSECA VALVERDE, foi funcionário neste laboratório, tendo exercido funções como técnico de análises clínicas no Hospital Cuf Infante Santo, desde 1 de Junho de 2003 até 1 de Junho de 2007.**

Lisboa, 01 de Abril de 2008

P' a Direcção Administrativa e Financeira

  
LABDIAGNÓSTICA  
Patologistas Clínicos Associados, Lda.

( Vitoria Mina )



## Anexo 35

### DECLARAÇÃO

Para os devidos e legais efeitos se declara que Carlos David da Fonseca Valverde, exerceu funções neste Centro Hospitalar, com categoria de Técnica de Análises Clínicas e Saúde Pública, nos seguintes regimes:

De 1 de Dezembro de 2003 a 31 de Dezembro de 2008, em regime de Contrato de Trabalho a Termo Certo;

De 1 de Janeiro de 2009 a 21 de Dezembro de 2011, em regime de Contrato de Trabalho em Funções Públicas a Termo Resolutivo Certo.

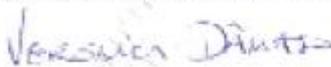
O tempo total de exercício efectivo das referidas funções, é seguinte:

- 8 anos e 20 dias.

Por ser verdade e ter sido pedida se passa a presente declaração que vai assinada e autenticada com o selo branco em uso nesta Instituição.

Centro Hospitalar de Torres Vedras, 21 de Dezembro de 2011.

O Serviço de Gestão de Recursos Humanos

  
**Verónica M.ª Félix Dâmaso**  
Técnico Superior

**Anexo 36**



**Declaração**

Para efeitos curriculares, declara-se que Carlos David da Fonseca Valverde exerceu a sua actividade profissional no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar de Torres Vedras. Demonstrou possuir boas qualidades de trabalho bom espírito de equipa, empenhamento tendo mantido sempre óptimas relações humanas e profissionais, primou pela pontualidade e assiduidade. Coordenou os estágios pedagógicos que tiveram lugar neste laboratório. Por me ter sido pedida, passo a presente declaração que dato e assino.

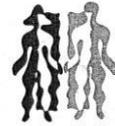
Torres Vedras, 30 de Novembro de 2011.

Maria Emília Sanches de Castro Osório  
(técnica coordenadora)

Anexo 37



CENTRO HOSPITALAR DE TORRES VEDRAS



MINISTÉRIO DA SAÚDE

**AVALIAÇÃO INDIVIDUAL TRIMESTRAL**

Pessoal Técnico de Diagnóstico e Terapêutica

Centro de Responsabilidade/Serviço: 50/2020/ 50/20202

Ano: 2021

Trim: 1.º

Nome do técnico contratado: Carlos David Valverde

N.º Mec.: 81911

	Satisfaz plenamente	Satisfaz	Não Satisfaz
<b>1 – Cumprimento das actividades</b>			
a) Organização e método de trabalho	x		
b) Colaboração activa nas realizações do Serviço	x		
<b>2 – Gestão de Recursos Materiais</b>			
a) Utiliza o material adequado à função	x		
a) Evita consumos desnecessários	x		
<b>3 – Relacionamento</b>			
a) Com os utentes	x		
<b>4 – Integração na filosofia do Hospital</b>			
a) Pontualidade	x		
b) Assiduidade	x		
c) Apresentação	x		
d) Postura em meio hospitalar	x		
e) Responsabilidade	x		
f) Motivação/Interesse	x		

NOTA: A classificação "não satisfaz" em qualquer das alíneas implica uma reavaliação mensal, que se reiterada passa a negativa.

O Avaliado

[Assinatura]

Data 15/03/2021

Chefia/ Avaliador

[Assinatura]

Data 15/03/2021

RUA DR. AURÉLIO RICARDO BELO

Telefone 261 319 300

Fax 261 319 299

2560-324 TORRES VEDRAS

Anexo 38



CENTRO HOSPITALAR DE TORRES VEDRAS



MINISTÉRIO DA SAÚDE

**AVALIAÇÃO INDIVIDUAL TRIMESTRAL**

Pessoal Técnico de Diagnóstico e Terapêutica

Centro de Responsabilidade/Serviço: 50/20201 50/20202

Ano: 2007

Trim: 3

Nome do técnico contratado: Carlos David Fonseca Valverde

N.º Mec.: 81911

	Satisfaz plenamente	Satisfaz	Não Satisfaz
<b>1 - Cumprimento das actividades</b>			
a) Organização e método de trabalho	X		
b) Colaboração activa nas realizações do Serviço	X		
<b>2 - Gestão de Recursos Materiais</b>			
a) Utiliza o material adequado à função	X		
a) Evita consumos desnecessários	X		
<b>3 - Relacionamento</b>			
a) Com os utentes	X		
<b>4 - Integração na filosofia do Hospital</b>			
a) Pontualidade	X		
b) Assiduidade	X		
c) Apresentação	X		
d) Postura em meio hospitalar	X		
e) Responsabilidade	X		
f) Motivação/Interesse	X		

NOTA: A classificação "não satisfaz" em qualquer das alíneas implica uma reavaliação mensal, que se reiterada passa a negativa.

O Avaliado

*[Signature]*

Data 6/6/2007

Chefia/ Avaliador

*[Signature]*

Data 06/06/2007

RUA DR. AURÉLIO RICARDO BELO

Telefone 261 319 300

Fax 261 319 299

2560-324 TORRES VEDRAS

**Anexo 39**



DECLARAÇÃO

Para os devidos efeitos se declara que Carlos David Valverde, prestou serviço no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Fernando Fonseca de Maio a Agosto de 2004.

Amadora, 04 de Janeiro 2010

Pela Direcção do Laboratório de Patologia Clínica

**Anexo 40**



---

## DECLARAÇÃO

Para os devidos efeitos se declara que **Carlos David da Fonseca Valverde**, portador do Cartão de Cidadão N.º 11892698, prestou serviço docente no âmbito da unidade curricular "Química Clínica I" do 3.º ano do Curso de Licenciatura em Análises Clínicas e Saúde Pública da Universidade Atlântica, num total de 8 horas no 1.º semestre do ano lectivo 2010/2011.

---

Barcarena, 11 de Abril de 2012

A Secretária-Geral,

Universidade  
**Atlântica**  
(Dr.ª Natália Espírito Santo)

**Anexo 41**



---

## DECLARAÇÃO

Para os devidos efeitos se declara que **Carlos David Valverde** do Centro Hospitalar de Torres Vedras, orientou os estágios de alunos do 3.º ano do Curso de Análises Clínicas e Saúde Pública da Escola Superior de Saúde da Universidade Atlântica, no ano lectivo de 2008/2009, conforme a seguir se discrimina:

- Valência de Hematologia, 1 aluno, num total de 120 horas.

---

Barcarena, 13 de Novembro de 2009

A Secretária-Geral,



## Anexo 42



## DECLARAÇÃO

Para os devidos efeitos se declara que o Dr. Carlos David Valverde, Técnico de Análises Clínicas e Saúde Pública do Centro Hospitalar de Torres Vedras, orientou o estágio de 3.º ano do Curso de Licenciatura em Análises Clínicas e Saúde Pública da Escola Superior de Saúde da Universidade Atlântica, no ano lectivo de 2009/2010, conforme a seguir se discrimina:

- Valência de Hematologia, um aluno, num total de 120 horas.

Barcarena, 11 de Março de 2011

A Secretária-Geral,

Universidade  
**Atlântica**  
(D.ª Natália Espírito Santo)

Anexo 43

DECLARAÇÃO

<b>Nome do colaborador:</b> CARLOS DAVID DA FONSECA VALVERDE	
<b>Empresa:</b> Kelly Services – a desempenhar Funções na Siemens Healthcare Diagnostics	
<b>Categoria Profissional:</b> Especialista de Aplicações	
<b>Data de início:</b> 19/12/2011	<b>Data de fim:</b> 18/10/2012

<b>Dados de Contacto</b> Kelly Services Av. Comandante Luís António da Silva, Edf. Bosque, 2 B, 2700-203 Amadora	<b>Telefone:</b> 21 492 9140
--	------------------------------

<b>Voltaria a admiti-lo/a?</b>	Sim <input checked="" type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>
--------------------------------	---	------------------------------

**Comentários**  
O David trabalhou através da Kelly Services, na Siemens Healthcare Diagnostics, e foi caracterizado como colaborador assíduo que "exerceu as suas funções de uma forma exemplar e contribuiu para os resultados muitos positivos do projecto em que esteve envolvido."

Entidade Empregadora

**KELLY**  
**SERVICES**  
Av. Comandante Luís  
António da Silva, 2 B  
2700-203 Amadora

CARA SAOTOS - CONSULTORA

Data: 18/10/2012

**KELLY**  
SERVICES

**Anexo 44**



REGIÃO AUTÓNOMA DOS AÇORES  
SECRETARIA REGIONAL DOS ASSUNTOS SOCIAIS  
DIRECÇÃO REGIONAL DE SAÚDE

**UNIDADE DE SAÚDE DA ILHA DAS FLORES**

**DECLARAÇÃO**

Maria Elizabete Avelar Nóia, Vogal Executiva do Conselho de Administração da  
Unidade de Saúde da Ilha das Flores.-----

Declara para os devidos efeitos, que Carlos David da Fonseca Valverde, Técnico  
de Diagnóstico e Terapêutica, foi designado para o Conselho Técnico da Unidade  
de Saúde da Ilha das Flores, em 29 de Outubro de 2012.-----

Por ser verdade e me ter sido pedida, passo a presente declaração, que dato e  
assino e vai autenticada com o selo branco em uso nesta Unidade de Saúde.-----

Santa Cruz das Flores, 20 de Novembro de 2012

-----  


**Anexo 45**



REGIÃO AUTÓNOMA DOS AÇORES  
SECRETARIA REGIONAL DA SAÚDE  
DIREÇÃO REGIONAL DE SAÚDE

*UNIDADE DE SAÚDE DA ILHA DAS FLORES*

---

Exmo. Senhor

**Carlos David Fonseca Valverde**

**Rua do Poço**

**2565 - 288 Paços de Ferreira**

Vossa referência	Vossa comunicação de	Nossa referência	Santa Cruz das Flores,
Nº:		Nº	<b>SAI-CSSCF/2013/372</b>
Proc.:		Proc.:	<b>29-05-2013</b>

**Assunto:** Término do período experimental

Para conhecimento de V. Exa. e devidos efeitos informa-se que no término do seu período experimental, e de acordo com os critérios de avaliação definidos na ata 1, do júri de acompanhamento, obteve a classificação de 19,16 valores.

Com os melhores cumprimentos,

O Conselho de Administração

RH-LM