

Início da Insulinoterapia na Diabetes Tipo 2: A Outra Insulinorresistência

P. Melo¹, J. L. Medina²

1- Assistente de Endocrinologia e Director do Serviço de Consulta Externa, Hospital de Santa Luzia, Unidade Local de Saúde do Alto Minho EPE, Viana do Castelo. Docente Voluntário de Endocrinologia, Faculdade de Medicina do Porto.

2- Director do Serviço de Endocrinologia, Hospital de S. João EPE, Porto.

Professor Catedrático de Endocrinologia, Faculdade de Medicina do Porto.

Resumo

A insulina é uma das principais terapêuticas na diabetes tipo 2. A sua necessidade é ditada pelos benefícios de um bom controlo glicémico e pela incapacidade do pâncreas endócrino em corresponder às crescentes exigências metabólicas características da insulinorresistência, com a consequente insulinodeficiência. As directrizes científicas destacam a importância de uma introdução atempada desta terapêutica, mas na prática clínica são múltiplos e significativos os obstáculos à sua iniciação, tanto por parte do doente como por parte dos profissionais de saúde.

Neste artigo revemos as principais questões práticas do início da insulinoterapia na diabetes tipo 2, particularmente a sua combinação com os antidiabéticos orais. A opção por esquemas simples, usualmente com administração única diária, e em baixas doses poderá ultrapassar as resistências a esta forma de tratamento e contribuir para um melhor controlo metabólico.

Abstract

Insulin is one of the mainstays of treatment for type 2 diabetes. Its necessity is determined by the benefits of a good glycemic control and by the failure of the endocrine pancreas to meet the increasing metabolic demands of this insulin-resistant condition, with corresponding insulin-deficiency. Scientific guidelines emphasize a timely introduction of this therapy but in clinical practice several significant barriers emerge, both from patients and health care providers. In this article we review the main practical issues regarding the initiation of insulin in type 2 diabetes, with special consideration to combination therapy with oral antidiabetic drugs. The option for more straightforward low-dose regimens, usually with once-daily injections, may overcome the resistance to this kind of treatment, thus contributing to an improved metabolic control.

É frequente confrontarmo-nos na prática clínica com a necessidade de instituir insulinoterapia crónica num doente com diabetes tipo 2. São vários os potenciais motivos para tal opção terapêutica mas destacam-se fundamentalmente dois: insuficiente controlo glicémico com a terapêutica em curso ou impossibilidade de continuação dos anti-diabéticos orais (ADO) por intolerância ou contra-indicação.

Abordamos aqui alguns aspectos relevantes da transição dos ADO para uma terapêutica combinada com insulina, com particular atenção às questões práticas da implementação. Assim, estarão fora do seu âmbito as situações de recurso à insulinoterapia por franca descompensação ou por contexto agudo (cirúrgico, traumático, obstétrico ou de patologia médica aguda), bem como os esquemas insulínicos mais complexos.

PORQUE SE TORNA NECESSÁRIA A INSULINOTERAPIA

A falência progressiva das células beta e a correspondente ausência de resposta à terapêutica oral leva a que se con-

sidere que a maioria dos doentes com diabetes tipo 2 venha a necessitar de insulinoterapia exógena⁽¹⁻³⁾. Apesar do carácter progressivo ser um dos actuais paradigmas da diabetes, alguns dados têm sugerido que uma intervenção eficaz e precoce possa alterar o rumo dos acontecimentos e permitir a estabilização do processo patológico⁽²⁾. Estudos *in vitro* têm mostrado que a glicotoxicidade promove não apenas a diminuição funcional como a perda de massa de células beta⁽⁴⁾. Daqui se deduz que é imprescindível actuar cedo para preservar ao máximo a capacidade de produção endógena de insulina, lutando contra a inércia terapêutica que permite que o doente permaneça demasiado tempo exposto a níveis glicémicos elevados, com o consequente agravamento do risco de complicações e eventual compromisso da resposta futura à intervenção farmacológica^(5,6).

De acordo com um estudo que comparou a abordagem de clínicos gerais com a de especialistas na área da diabetes, os três principais motivos apontados por ambos os grupos para o início da insulinoterapia na diabetes tipo 2 foram o grau de elevação da HbA1c, os perfis glicémicos efectuados pelos doentes e a existência de co-morbilidades⁽⁷⁾. Na prática verifica-se que as contra-indicações para os ADO (como, por exemplo, a insuficiência renal) constituem razões comuns para o início da insulinoterapia⁽⁸⁾.

A insulina é a mais antiga das terapêuticas farmacológicas actualmente disponíveis, o que lhe confere a não negligenciável vantagem da longa experiência. Originalmente desenvolvida para a diabetes tipo 1, rapidamente se viu aplicada noutras formas da doença, dada a sua eficácia hipoglicemiante e,

Correspondência:

Pedro Melo

Unidade de Endocrinologia

Hospital de Santa Luzia – ULSAM EPE – Viana do Castelo

Estrada de Santa Luzia

4901-858 Viana do Castelo

E-mail: pedro.melo@cham.min-saude.pt

nas suas formulações humanas, dado o seu relativo baixo preço. Ao estimular a captação periférica de glicose e ao diminuir a sua produção hepática, a insulina é o meio mais eficaz para a redução glicémica, proporcionando descidas da HbA1c na ordem dos 1,5 a 3,5%^(8,9). A isto somam-se os benefícios que transcendem a simples redução da glicemia, designadamente no que respeita a factores de risco cardiovascular^(9,10).

O estudo TEDDI – Controlo Metabólico e Terapêutica dos Doentes Diabéticos em Consultas Diferenciadas – mostrou que nestas consultas quase metade dos doentes com diabetes tipo 2 se encontrava sob insulino terapia (isolada ou em associação com ADO)⁽¹¹⁾, admitindo-se que ao nível dos cuidados primários de saúde a proporção de doentes sob insulino terapia seja substancialmente menor.

QUANDO E COMO DEVEMOS INICIAR A INSULINOTERAPIA NA DIABETES TIPO 2

O algoritmo proposto na declaração de consenso da “American Diabetes Association” (ADA) e da “European Association for the Study of Diabetes” (EASD), publicado este ano, e as Recomendações da Sociedade Portuguesa de Diabetologia colocam a insulino terapia, como *add-on*, desde logo na segunda linha da terapêutica, quando a intervenção no estilo de vida associada à máxima dose tolerada de metformina não se revelam suficientes para alcançar e manter um controlo glicémico aceitável (tendo como referência uma HbA1c igual ou inferior a 7%). Esta segunda linha é partilhada com as sulfonilureias (e com outros fármacos, em contextos específicos), com a recomendação de que a insulina deve ser preferida nos casos de pior controlo, manifesto por HbA1c superior a 8,5% (ou 1,5% acima do alvo) ou por sintomas secundários à hiperglicemia^(8,9). O início ou a intensificação da insulino terapia equaciona-se ainda nas subsequentes linhas de intervenção, caso as opções anteriores se revelem insatisfatórias, ou quando um acentuado grau de descompensação a tal aconselha^(8,9). Estas perspectivas são, na sua orientação geral, compatíveis com a posição da “International Diabetes Federation” (IDF) expressa nas suas “Global Guidelines for Type 2 Diabetes” de 2005⁽¹²⁾. Na prática é mais comum o início da insulino terapia quando as doses máximas de 2 ou mais ADO não são suficientes para se atingir o grau de controlo glicémico recomendado; nestes casos e após 1 a 3 meses (ou mais, no caso das tiazolidinedionas devido à sua acção mais lenta), estará indicada uma insulina basal⁽³⁾.

Embora se reconheça que em doentes com elevações modestas da HbA1c (na ordem dos 7,5%) haja um maior contributo da hiperglicemia pós-prandial, a qual não é directamente abrangida pela insulino terapia basal⁽²⁾, esta pode beneficiar pela redução da glicemia global/basal e pelo já referido efeito na diminuição da glicotoxicidade, permitindo uma recuperação parcial do efeito dos antidiabéticos orais.

O recurso à terapêutica combinada de antidiabéticos orais com insulino terapia em toma única diária, cada vez mais atraente com a disponibilização de análogos de acção mais prolon-

gada, surge como uma boa alternativa inicial, ao abrir a porta de forma mais suave a uma nova abordagem. Deste modo poderão ser ultrapassadas, mais facilmente, as naturais resistências à adopção de injectáveis, para além de que, optando por doses mais baixas em fases iniciais, será muito menos provável a ocorrência de hipoglicemias, contribuindo para a aceitabilidade deste tratamento por parte do doente, da sua família e mesmo por parte dos profissionais de saúde^(3,9,13).

Durante muitos anos esta insulino terapia basal assentava unicamente na insulina NPH (NPH - *Neutral Protamine Hagedorn*), só recentemente complementada com os análogos de acção mais prolongada. Estes análogos, como a insulina detemir ou, principalmente, a insulina glargina, apresentam menor variabilidade de actuação e menores riscos de hipoglicemia, pelo que surgem como opções relevantes que têm no seu custo mais elevado o principal factor limitante. As propostas actuais partem geralmente da administração de uma dose única diária, que deverá ocorrer sempre na mesma altura do dia, de forma a assegurar uma adequada cobertura. Caso esta cobertura se revele insuficiente, tanto a NPH como a detemir poderão ter a dose diária total dividida em duas administrações^(3,12,14). (Quadro I)

Como alternativas estão disponíveis as pré-misturas (insulina bifásica) em proporções variáveis de insulina de acção curta/rápida e de acção intermédia, ou ainda, quando os regimes anteriormente indicados não proporcionam um controlo satisfatório, os esquemas intensificados basal-bolus, com múltiplas administrações^(3,12). A opção por regimes de insulino terapia em pré-mistura ou de administração prandial revelou-se mais exigente e menos satisfatória, condicionando maior ganho ponderal e aumento na incidência de hipoglicemias^(2,15). Podem ser, no entanto, soluções interessantes quando o perfil glicémico (com acentuados picos prandiais) aponta nesse sentido. Já a insulino terapia intensiva, semelhante à utilizada na diabetes tipo 1, é bastante mais exigente e terá indicação nos doentes cujo controlo desejável não é obtido com as abordagens anteriores⁽⁹⁾.

O início da insulino terapia reflecte-se em efeitos benéficos glicémicos e extra-glicémicos, mas associa-se a ganhos ponderais relevantes, ainda que relativamente discretos (em média 2 a 4 kg), os quais poderão ser atribuídos à correcção da glicemia e à redução das perdas por glicosúria^(8,9). Este aumento de peso deve ser tido desde logo em conta pois pode condicionar agravamento do risco cardiovascular e poderá

Quadro I - Insulinas basais.

Insulina	Início da Acção	Pico	Duração da acção
NPH* (acção intermédia)	1-2 horas	4-8 horas	10-16 horas
Glargina (acção longa)	2-4 horas	Sem pico	20-24 horas
Detemir (acção intermédia)	Cerca de 2 horas	Sem pico	6-24 horas**

* NPH - *Neutral Protamine Hagedorn*

** Dependendo da dose

Quadro II - Barreiras ao início da insulinoterapia (Médico e Doente).

Barreiras por parte do Médico	<ul style="list-style-type: none"> • Preocupações com as complicações hipoglicémicas; • Aumentos no uso dos recursos (p. ex. consultas e análises); • Incerteza sobre os potenciais benefícios da insulinoterapia; • Preocupações acerca da adesão do doente ao esquema terapêutico proposto; • Ganho de peso; • Perspectiva da insulina como terapêutica de último recurso; • Perspectiva dos regimes como sendo complexos; • Crença de que há aumento do risco cardiovascular; • Crença de que será necessário dedicar mais tempo se os episódios de hipoglicemia aumentarem em frequência ou gravidade.
Barreiras por parte do Doente	<ul style="list-style-type: none"> • Perspectiva do início da insulinoterapia como uma indicação de que a doença se agravou e receios de complicações graves (p. ex. deterioração de órgãos, cegueira); • Crença de que o início da insulinoterapia indica a incapacidade de assumir o seu próprio cuidado; • Receio da dor associada à injeção; • Ansiedade sobre a técnica de injeção adequada; • Inconveniência das injeções diárias; • Preocupações com as potenciais hipoglicemias; • Incerteza sobre os potenciais benefícios da insulinoterapia; • Falso conceito de que a insulina é desnecessária pois outros tratamentos funcionaram no passado; • Receios de estigmatização por parte da família, amigos e colegas; • Custo do tratamento; • Preocupação com ganho de peso.

Adaptado com permissão ⁽¹⁰⁾

ter repercussões indesejáveis noutros aparelhos e sistemas, nomeadamente a nível osteo-articular. Compreensivelmente poderá também condicionar a vontade do doente para iniciar ou manter a insulinoterapia ⁽⁹⁾. Tendo presente que a abordagem da diabetes tipo 2 tem no controlo do peso um dos seus pilares, qualquer intervenção que o comprometa (como a utilização de sulfonilureias, tiazolidinedionas ou insulina) exige uma adequada e atempada explicação ao doente.

Com o início da insulinoterapia basal poderá ser mantida a terapêutica com metformina, como também as sulfonilureias e os inibidores da alfa-glicosidase; já com as tiazolidinedionas importa ponderar o risco de desenvolvimento ou agravamento de insuficiência cardíaca. Uma vez iniciada a insulinoterapia, deve-se especificamente mencionar que esta não substitui mas antes complementa os cuidados com a alimentação ou com a necessidade de actividade física ⁽¹²⁾.

DETERMINAR E AJUSTAR A DOSE

A dose inicial proposta é geralmente em torno de 0,15 a 0,2 unidades/dia por quilograma de peso corporal, o que se traduz habitualmente por entre 6 e 12 unidades diárias de insulina de acção intermédia ao deitar ou de insulina de acção prolongada ao deitar (*bedtime*) ou de manhã ^(2,8,9,15). Ao contrário de outros fármacos, a insulina não tem propriamente dose máxima e, aumentando-se a quantidade, aumenta-se o seu efeito hipoglicemiante. As doses utilizadas podem ser relativamente elevadas (na ordem dos 40 a 100 unidades

por dia, ou mesmo mais) e ultrapassar em muito as que se usam na diabetes tipo 1, dado o fundo de insulinoresistência que caracteriza a diabetes tipo 2 ^(9,12).

Para evitar complicações agudas e até atenuar previsíveis receios por parte do doente e dos profissionais de saúde, será pertinente começar com doses relativamente baixas. Tal facto deve ser dado a conhecer ao doente, de forma a tranquilizá-lo e a prepará-lo para a probabilidade destas doses virem a ser progressivamente aumentadas de forma significativa. O objectivo da intervenção terapêutica é a obtenção de glicemias em jejum inferiores a 110 mg/dL, efectuando a pesquisa em jejum e antes da principal refeição e, sempre que possível, noutras alturas do dia. Assim sendo, propõe-se a vigilância diária através de glicemias capilares com progressivo aumento das doses – 2 unidades por dia cada 3 dias – até que as glicemias em jejum se enquadrem nos valores alvo (70-130mg/dL), podendo o aumento ser maior (p. ex. 4 unidades) se as glicemias em jejum permanecerem acima dos 180 mg/dL. Se ocorrer hipoglicemia (ou glicemia inferior a 70 mg/dL) a dose ao deitar deverá ser reduzida em 4 unidades ou em 10% se a dose em causa for superior a 60 unidades ^(8,12).

Caso se verifique que com esta abordagem não conseguimos obter um controlo adequado após 2 a 3 meses, ou se a ocorrência de hipoglicemias limitar o aumento das doses, dever-se-á avançar para esquemas com múltiplas administrações de insulina ^(2,8).

Embora sendo uma das opções terapêuticas fundamentais, e a mais eficaz do ponto de vista do controlo glicémico propriamente dito, os resultados dos estudos mais recentes com a insulinoterapia na diabetes tipo 2 desapontam ao re-

velarem muitas dificuldades em se atingirem os objectivos propostos nas directrizes ⁽¹⁵⁾.

OBSTÁCULOS E RESISTÊNCIAS AO INÍCIO DA INSULINOTERAPIA

É geralmente com receio que os doentes encaram o momento de iniciar o tratamento com insulina. Para isto contribui o desconhecimento da situação e um conjunto de preconceitos e fantasias associados a uma hormona anabolizante envolvida por uma aura dúplice. Também é certo que muitos médicos e outros profissionais de saúde receiam a introdução de insulina pela complexidade inerente (e inevitável ocupação de tempo e de recursos), pelos potenciais riscos de hipoglicemia e pela própria reacção que esperam por parte dos doentes. Vários são os motivos para que, por vezes, se estabeleça uma cumplicidade que adia um tratamento indispensável ^(10,16). (Quadro II)

No já referido estudo envolvendo clínicos gerais e especialistas em diabetes, as principais barreiras ao início da insulino-terapia indicadas pelos primeiros foram os receios e a relutância dos doentes perante as injeções de insulina (68%), e a preferência destes por conceder mais oportunidades a que as intervenções no estilo de vida e com ADO's surtam efeito (68%). Pelo contrário, os especialistas não mencionaram nenhuma barreira *major* a este nível ⁽⁷⁾.

Outro dos factores limitantes da insulino-terapia, em larga medida fruto da sua eficácia, é, como já foi referido, o risco de hipoglicemias. Este deve ser tido em conta e devidamente contextualizado no plano terapêutico individual. Este risco é na diabetes tipo 2 bastante menor que na tipo 1 (cerca de 3 versus 61 episódios de hipoglicemia grave/100 doentes/ano), mas deve ser debatido e acautelado, e é compreensivelmente maior quanto mais baixo é o nível de HbA1c pretendido. Espera-se que, comparativamente com a insulina humana, o recurso aos análogos permita um melhor controlo glicémico sem agravamento do risco de hipoglicemia, seja com o perfil aplanado dos análogos de acção lenta seja com a menor duração dos análogos de acção rápida.

A vigilância glicémica é fundamental na insulino-terapia, mas a sua intensidade e distribuição variam consoante a opção terapêutica concreta e o contexto individual do doente. Um registo diário apenas em jejum é escasso, mas poderá ser usado em doentes relativamente estáveis, sem sintomas de hipoglicemia, e que tomem insulina apenas uma vez por dia, ao jantar ou ao deitar. Um maior número de registos, incluindo jejum e antes de jantar (eventualmente outros ao longo do dia), será desejável para uma melhor monitorização e consequente adequação do regime terapêutico ⁽²⁾. Embora não esteja definido de forma clara qual é o melhor esquema de vigilância glicémica, parece-nos útil a realização de 'perfis' glicémicos de periodicidade regular, abrangendo rotativamente os vários dias da semana (o que pode ser obtido efectuando-o de 10 em 10 dias, p. ex. nos dias 10, 20 e 30 de cada mês), de forma a ter um panorama global das excursões glicémicas que permita otimizar a opção e distribuição da farmacoterapia.

INSULINOTERAPIA ENQUANTO OPORTUNIDADE

Uma situação com que frequentemente nos deparamos na prática clínica e que nos coloca perante a iminência do recurso à insulino-terapia é a má adesão de base às medidas farmacológicas e não farmacológicas. Infelizmente a diabetes não tem um efeito mobilizador tão precoce quanto o desejável, que deveria ocorrer na ocasião do diagnóstico ou, melhor ainda, logo que fosse identificado uma maior predisposição ao desenvolvimento da doença (p. ex. pela história familiar, pelos antecedentes de diabetes gestacional, etc). Também a toma de medicação por via oral é incorporada no quotidiano sem habitualmente exigir grandes mudanças, ou seja, não constitui por si só, um marco existencial que induza uma reflexão e, eventualmente, imponha uma alteração efectiva no estilo de vida.

O mesmo já não se passa com a insulina: ao implicar, pelo menos nas formulações actualmente disponíveis, a administração por via injectável vai marcar, necessariamente, um ponto de viragem. Os compreensíveis receios associados a esta forma de administração, juntamente com a apreensão, de fundamentação mais variável, com os efeitos da própria hormona, cunham o momento e concorrem para que uma atenção especial seja dispensada a esta transição. Isto constitui uma soberana oportunidade de intervenção.

Muitos doentes só quando confrontados com a insulino-terapia enquanto imperativo médico, assumem a necessidade de concretizar as medidas não farmacológicas, seguindo as orientações alimentares e cumprindo os níveis de actividade física aconselhados. O receio da insulino-terapia, mais ou menos fundamentado, pode constituir um incentivo à adesão à terapêutica anteriormente proposta. Mas este incentivo tem de ser bem gerido: poder-se-á negociar com o doente o adiamento da insulino-terapia sob promessa de maior investimento na terapêutica em curso (com eventual reajuste), mas não se deverá aceitar um prolongamento incondicional, que apenas contribua para uma maior degradação pancreática e exposição glicémica. Embora esta seja uma vertente potencialmente útil da conotação negativa da insulina, não se deverá exacerbar a sua 'demonização', pois muitos destes doentes dela necessitam ou virão a necessitar, e se a sua imagem for muito degradada contribuir-se-á para agravar a resistência à sua futura introdução ⁽¹⁶⁾.

Verifica-se que muitos casos de insuficiente controlo metabólico por má adesão ao plano terapêutico podem, graças a esta consciencialização, apresentar assinaláveis melhorias que tornam dispensável, pelo menos no imediato, a introdução da insulino-terapia ⁽¹⁶⁾. Este aspecto deve ser abordado com o doente, mas qualquer adiamento deve ser alvo de reavaliação clara e objectiva a curto prazo; naturalmente que deverá haver sensibilidade para considerar as situações excepcionais e os contextos da esfera pessoal que podem, num determinado momento, ditar um insuficiente controlo glicémico. Nestes casos, uma vez ultrapassados ou atenuados os constrangimentos, deverá ser novamente equacionada a mudança da estratégia terapêutica. Impõe-se uma actua-

ção distinta consoante estejamos perante um doente que apresenta motivos fundamentados para esperar que o controlo melhore sem necessidade de insulino-terapia ou um doente que apenas tenta adiar um tratamento necessário, sem apresentar razões que tornem a próxima oportunidade de introdução da insulina mais propícia do que a actual. Assumindo a opinião técnica de que a insulino-terapia se mostra indicada no momento, e discutindo as potenciais consequências do adiamento, devemos deixar muito claro que se respeita a decisão do próprio doente. Como é óbvio, estas perspectivas não se aplicam às situações de descompensação acentuada, que requerem intervenção imediata. Justifica-se um sinal de alerta para o facto de que, habitualmente, o benefício clínico obtido com o aumento das doses para níveis máximos de ADO é modesto e acompanha-se de um incremento relevante dos efeitos secundários. Assim sendo, será aconselhável não insistir em demasia nesta abordagem, protelando a insulino-terapia, pois tal irá comprometer a futura capacidade de resposta terapêutica.

ALGUMAS QUESTÕES PRÁTICAS

Para o doente com diabetes tipo 2 o início do tratamento com insulina é muitas vezes considerado o derradeiro passo no âmbito do que classificam como 'diabetes em último grau'. É óbvio que alguns dos receios que aqui se manifestam são pertinentes, como são os casos do aumento ponderal e do risco de hipoglicemias. Relativamente ao primeiro torna-se necessário explicar que boa parte do peso ganho corresponde a uma recuperação do peso que, em circunstâncias normais (i.e. sem um mau controlo da diabetes), a pessoa deveria ter; destaca-se aqui a oportunidade de reforçar a intervenção não farmacológica, optimizando o plano alimentar e o plano de actividade física (e, evidentemente, alertando para a importância do seu cumprimento efectivo) de forma a contrariar este aumento.

Relativamente às hipoglicemias, trata-se de um receio justificado, baseado no simples facto de que a insulina é o mais eficaz dos hipoglicemiantes e de que, quanto mais próximas as glicemias habituais estiverem dos valores considerados 'normais', maior será o risco de surgir uma hipoglicemia numa qualquer oscilação descendente (p. ex. quando uma refeição é mais ligeira ou mais tardia do que o habitual). A adopção de um esquema progressivo e de início suave permitirá conquistar a confiança indispensável a esta opção terapêutica.

Também o receio mítico da 'dependência' da insulina, nos seus contornos toxicológicos associados à administração injectável, surge como um dos mais mencionados, e deve ser desmistificado fazendo referência ao estatuto fisiológico da hormona e à sua utilização temporária, sem problemas relevantes, nas situações de doença aguda ou de cirurgia. Quanto ao receio da própria injeção, vemos que o mesmo se encontra associado à dimensão imaginada da agulha, a que sobrevém depois a admiração perante a típica agulha de 31G. Não raramente os doentes ficam surpreendidos com a facilidade de administração e com a quase ausência da dor,

reconhecendo que a utilização de insulina não é tão complexa nem tão custosa como haviam acreditado.

As apreensões em torno da insulino-terapia constituem, pois, uma outra forma de 'insulinorresistência' que, com frequência, se apoia em meias-verdades naturalmente difíceis de desmontar. A sua abordagem requer mais tempo e maior disponibilidade mas, na maioria dos casos, é possível colocar as dúvidas e os receios nas suas devidas proporções, quanto mais não seja criando a abertura de espírito que contemple a hipótese de experimentar.

Importa não apenas veicular informações, mas também transmitir enfaticamente a magnitude do que está em causa. Para a pessoa com diabetes pode ser desde logo evidente que a insulino-terapia é um elemento que irá melhorar o controlo metabólico; já não serão tão evidentes a dimensão e as repercussões dessa melhoria, como não será tão evidente o facto do simples 'adiamento' limitar o benefício efectivo quando, um dia, esta farmacoterapia vier a ser instituída. No âmbito da educação terapêutica, o doente é o elemento fulcral e participante activo na orientação esclarecida do seu problema. Assim, é fundamental integrá-lo e fazê-lo sentir-se integrado no processo decisório em que são discutidas as diversas opções.

Por natureza sociocultural, desde há muito que o panorama nacional é dominado pelo paradigma da doença aguda, em que intervenções directivas e de curta duração têm reconhecida eficácia. A diabetes, como doença crónica, exige uma abordagem distinta que envolve não apenas o próprio doente como a sua família e conviventes, de modo a propiciar uma adequada transição para a insulino-terapia. Atingindo desproporcionalmente as faixas etárias mais elevadas, esta doença acarreta as dificuldades inerentes à maior prevalência de co-morbilidades, de limitações sensoriais e até de iliteracia. A nossa intervenção deve, pois, recorrer a uma linguagem simples e clara, que convide o doente a participar de forma tranquila e segura no seu próprio tratamento, sempre com a garantia de poder esclarecer as suas dúvidas e ansiedades.

O início da insulino-terapia é também um momento para rever, de modo breve e adequado a cada caso, os conceitos de diabetes tipo 2, contribuindo para a aceitabilidade de uma terapêutica crónica injectável. Aqui poderá ser útil o recurso à metáfora e à comparação com situações correntes, que ilustrem a evolução do processo fisiopatológico e que, sem entrarem em pormenores desnecessários ou em descrições exaustivas, proporcionem um quadro explicativo inteligível e promotor de uma participação activa.

CONCLUSÕES

A insulino-terapia é um passo frequente no tratamento da diabetes tipo 2 quando o controlo permanece insuficiente ou quando algum factor impede ou condiciona a utilização dos anti-diabéticos orais. É um passo que frequentemente gera resistências e levanta dificuldades a vários níveis, muitas mais imaginárias que reais, que exigem uma abordagem integradora e compreensiva.

O início da insulinoterapia é também uma ocasião ímpar para a melhoria desta doença crónica, seja na objectividade do controlo metabólico, seja na relação da pessoa com a sua doença e com os profissionais de saúde; pode ainda ser o momento-chave para reforçar, de forma realista e consequente, as medidas não-farmacológicas que alicerçam a estratégia terapêutica desta patologia.

Considerando a fisiopatologia da diabetes e das suas complicações, parece-nos mais útil avançar atempadamente para uma insulinoterapia menos ambiciosa na sua fase inicial, mas que, pela sua baixa dose, seja simples e segura. Na prática clínica esta abordagem permite ultrapassar os obstáculos previsíveis e pode mesmo romper o ciclo da glicotoxicidade, promovendo melhorias muito significativas não só no *status* metabólico imediato como no prognóstico global da doença.

BIBLIOGRAFIA

1. Turner RC, Cull CA, Frighi V, Holman RR for the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Glycemic Control With Diet, Sulfonylurea, Metformin, or Insulin in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: Progressive Requirement for Multiple Therapies (UKPDS 49). *JAMA*. 1999; 281: 2005-12.
2. Hirsch IB, Bergenstal RM, Parkin CG, Wright Jr E, Buse JB. A Real-World Approach to Insulin Therapy in Primary Care Practice. *Clinical Diabetes*. 2005; 23(2): 78-86.
3. Fonseca V. The Role of Basal Insulin Therapy in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Insulin*. 2006; 1: 51-60.
4. Maedler K, Donath MY. Beta-Cells in Type 2 Diabetes: A Loss of Function and Mass. *Horm Res*. 2004; 62(suppl 3): 67-73.
5. Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. *JAMA*. 2002; 287(19): 2563-9.
6. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ*. 2000; 321(7258): 405-12.
7. Grant RW, Wexler DJ, Watson AJ, Lester WT, Cagliero E, Campbell EG, Nathan DM. How Doctors Choose Medications to Treat Type 2 Diabetes – A national survey of specialists and academic generalists. *Diabetes Care*. 2007; 30: 1448-53.
8. Duarte R, Rodrigues E, Sequeira-Duarte J, Duarte A, Almeida-Ruas MM e grupo de trabalho da SPD. Recomendações da Sociedade Portuguesa de Diabetologia para o Tratamento da Hiperlicemia e Factores de Risco na Diabetes Tipo 2. *Revista Portuguesa de Diabetes*. 2007; 2 (4) Suppl: 5-18.
9. Nathan DM, Buse, JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, Zinman B. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy – A consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 2009; 32: 1-11.
10. Vinik A. Advancing Therapy in type 2 Diabetes Mellitus with Early, Comprehensive Progression from Oral Agents to Insulin Therapy. *Clin Ther*. 2007; 29(Theme Issue): 1236-53.
11. Cardoso SM, Duarte R, Boavida JM, Carvalheiro M, Carvalho D, Gardete-Correia L. Controlo Metabólico e Terapêutica dos Doentes Diabéticos em Consultas Diferenciadas – Resultados do Estudo TEDDI. *Revista Portuguesa de Diabetes*. 2008; 3 (1): 5-12.
12. International Diabetes Federation - Global Guidelines for Type 2 Diabetes, 2005.
13. Riddle MC. Starting and Advancing Insulin for Type 2 Diabetes: Algorithms and Individualized Methods Are Both Necessary. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93(2): 372-4.
14. Rosenstock J, Davies M, Home PD, Larsen J, Koenen C, Schernthaner G. A randomised, 52-week, treat-to-target trial comparing insulin detemir with insulin glargine when administered as add-on to glucose-lowering drugs in insulin-naive people with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51 (3): 408-16.
15. Riddle MC, Rosenstock J, Gerich J, and Insulin Glargine 4002 Study Investigators. The Treat-to-Target Trial: Randomized addition of glargine or human NPH insulin to oral therapy of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2003; 26 (11): 3080-6.
16. Peyrot MM, Rubin RR, Lauritzen T, Skovlund SE, Snoek FJ, Matthews DR, et al. Resistance to Insulin Therapy Among Patients and Providers - Results of the cross-national Diabetes Attitudes, Wishes, and Needs (DAWN) study. *Diabetes Care*. 2005; 28: 2673-9.

Novas Perspectivas para a Diabetes Tipo I – A Vacina

S. Silva¹, N. Cabanelas², M. C. Esteves³

Serviço de Medicina I (Dir: Dr. Manuel João Gomes), Hospital de Santarém, EPE

1- Interna 1º ano do Internato Complementar de Pneumologia

2- Interno 1º ano do Internato Complementar de Cardiologia

3- Assistente Hospitalar Graduada de Medicina Interna

Resumo

Introdução: A diabetes tipo I é reconhecida hoje como uma doença auto-imune. Assim sendo, numerosos anticorpos dirigidos contra constituintes das células β podem ser detectados na fase pré-clínica, permitindo uma intervenção terapêutica precoce.

Objectivo: Dos vários anticorpos referidos destacam-se os anti-descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD). Neste artigo pretende-se efectuar uma revisão sobre a sua relevância clínica, bem como a importância do desenvolvimento de uma vacina para a diabetes tipo I.

Métodos: Procedeu-se a revisão bibliográfica de publicações sobre os anticorpos anti-GAD e a vacina para a diabetes tipo I perspectivando as suas consequências na abordagem terapêutica.

Resultados: Actualmente em ensaios clínicos de fase II, a vacina utiliza como substância activa uma isoforma de GAD65 numa formulação standardizada com alumínio.

Conclusões: Esta vacina poderá vir a constituir num futuro próximo uma forma de abordagem eficaz ao promover a preservação da função pancreática residual.

Abstract

Introduction: Type I diabetes is recognized today as an autoimmune disease. Many antibodies against β cell constituents can so be detected in a pre-clinical phase, allowing an early therapeutic intervention.

Aims: The anti-glutamic acid decarboxylase (anti-GAD) are the main antibodies. In this article we will review their clinical relevance and the importance of the development of a vaccine for type I diabetes.

Methods: We made a bibliographic revision of publications about antibodies anti-GAD and the vaccine for type I diabetes describing their consequences by being used as a therapy for this disease.

Results: Today in phase II of clinical trials, the vaccine is based on an alum-formulated 65-kD isoform of GAD.

Conclusions: This vaccine may become, very soon, an effective therapeutic approach in type I diabetes by promoting the preservation of residual pancreatic function.

INTRODUÇÃO

A diabetes tipo I é, ainda hoje, uma doença com uma morbilidade e mortalidade significativas. É reconhecida como uma doença crónica, caracterizada por carência absoluta ou relativa em insulina.

A sua etiopatogenia resulta de um processo auto-imune dirigido contra a célula β pancreática. Este processo de auto-imunidade é desencadeado por factores ambientais em indivíduos geneticamente predispostos ⁽¹⁾. A fase de agressão auto-imune antecede o diagnóstico de diabetes e caracteriza-se pelo aparecimento de vários anticorpos dirigidos contra constituintes da célula β pancreática. Destes, destacam-se: anticorpos anti-insulina (IAA), anticorpos anti-ilhéus (ICA) e anticorpos anti-descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD). Histologicamente esta fase é demonstrada por insulite secundária a reacção inflamatória anti-ilhéu (com infiltrado linfocitário) ⁽¹⁾.

Os anti-GAD, envolvidos na insulite, são altamente específicos, sensíveis e de fácil detecção. Tornam-se assim, os marcadores ideais para o diagnóstico precoce de doentes dia-

béticos (diabetes tipo I) em fase pré-clínica de doença, fase na qual se justifica a intervenção terapêutica como forma de preservar a função β celular.

A utilização de auto-antígeno GAD como intervenção imunomoduladora tem, nos últimos anos, vindo a revelar grande importância. Estudos realizados em animais comprovaram que a sua utilização em fase precoce de doença poderia prevenir ou retardar a progressão para a hiperglicémia ⁽²⁾.

VACINAS COMO INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA

O termo “vacina” surgiu no final do século XVII com Jenner, referindo-se ao vírus da varíola bovina, naquela que foi a primeira tentativa médica de prevenção de uma doença infecciosa ⁽³⁾. Nessa altura, era total o desconhecimento dos fundamentos fisiológicos da resposta imunológica. Um século mais tarde, Pasteur lança a base das teorias que explicam o processo de vacinação e microorganismos modificados começam a ser utilizados para gerar protecção imune ⁽³⁾. Em 1957 foi elaborada a teoria da selecção clonal e em 1965 foram identificados os linfócitos T e B.

Desde então, um longo caminho se percorreu na clarificação dos fenómenos que regulam o sistema imune e explicam o mecanismo de vacinação. Este, caracteriza-se pela indução do aparecimento de células de memória capazes de produzir anticorpos específicos contra determinado antígeno de forma rápida e em quantidades suficientes ⁽⁴⁾.

Correspondência:

Sónia Silva

Avenida Bernardo Santarém

2005-177 Santarém

Tlm.: 919990346

Fax: 243300296

E-mail: soniasilva00@gmail.com

Quadro I - Exemplos de tipos de antígenos utilizados em algumas vacinas.

Tipo de Antígeno	Exemplos
Organismos vivos	
Natural	<i>Vaccinia</i>
Atenuado	Sabin (anti-poliomielite), sarampo, rubéola, anti-varicela zoster, BCG
Organismos inactivados e intactos	
Vírus	Salk (anti-poliomielite), raiva, <i>influenza</i> , hepatite A, tifo
Bactérias	Febre tifóide, tosse convulsa, cólera
Fragmentos celulares	
Polissacarídeos celulares	Anti- <i>Pneumococos</i> , Anti- <i>Meningococos</i> , Anti- <i>Haemophilus influenzae</i>
Antígenos de superfície	Hepatite B
Toxóides	Tétano, Difteria
DNA recombinante	
Genes clonados	Hepatite B

Hoje em dia, existe uma ampla gama de preparações antigénicas que são utilizadas como vacinas. Os antígenos contidos nas preparações podem ser organismos vivos atenuados, intactos mas inactivados, fragmentos celulares, antígenos de superfície, toxóides e produtos obtidos com DNA recombinante, por engenharia genética. O Quadro I mostra alguns exemplos de cada um destes tipos de vacinas ⁽⁵⁾.

Em geral, quanto maior a quantidade de antígenos presentes na preparação, maior será a sua eficácia. Além disso, as vacinas preparadas com organismos vivos são mais imunogénicas que as de antígenos microbianos inactivados, conferindo assim maior protecção. As vacinas que utilizam toxinas inactivadas e toxóides são também muito eficazes ⁽⁵⁾.

Recentemente surgiram as vacinas anti-idiótipo, que são constituídas por moléculas proteicas que funcionam como anticorpo contra o idiótipo de determinado anticorpo já presente no hospedeiro. Dessa forma, o anti-idiótipo comporta-se como um antígeno capaz de gerar memória imunológica mais facilmente, pelo facto de ser constituído por moléculas proteicas. Este tipo de preparação torna-se especialmente eficaz quando se está na presença de estruturas de superfície não suficientemente imunogénicas para gerar memória imunológica, como acontece com os antígenos polissacarídicos e lipídicos ⁽⁵⁾.

Com o decorrer dos anos, a comunidade científica tem vindo a tentar aplicar os princípios da imunização contra doenças infecciosas na prevenção de outro tipo de patologias e processos fisiológicos que afectam as populações. Foi desenvolvida e tornada acessível à generalidade das pessoas, pela primeira vez, uma vacina que previne o aparecimento de uma neoplasia maligna (anti-Papiloma Vírus Humano), se bem que não deixe de o fazer de forma secundária à prevenção de uma infecção.

Além disso, no âmbito experimental, estão em investigação, entre outras, vacinas como forma de prevenção de infertili-

dade, hipertensão arterial (pela inibição do eixo renina-angiotensina) ⁽⁶⁾ e da diabetes tipo I.

VACINA COM ANTIGÉNIO GAD

O GAD é uma proteína encontrada nos ilhéus secretores de insulina do pâncreas e no cérebro. Em doentes susceptíveis, esta proteína pode funcionar como auto-antígeno desencadeando processo patológico conduzindo respectivamente à diabetes tipo I e à doença de Stiff-man ⁽⁷⁾.

O processo auto-imune envolve não só as células T citotóxicas mas também a formação de auto-anticorpos.

Defeitos no sistema imunológico como a incapacidade de formar células T reguladoras fundamentais na imunoregulação parecem estar na base de todo o processo auto-imune.

Na diabetes, o reconhecimento dos vários elementos envolvidos nesse processo de insulite constituiu um passo fundamental para a identificação de possíveis alvos terapêuticos.

Tratando-se de um estado “hiperimune” a utilização de agentes imunossupressores tem sido explorada, como forma de intervenção terapêutica na diabetes recém diagnosticada.

A Ciclosporina, Azatioprina e Metotrexato, apesar do seu sucesso na redução das necessidades de insulina diária nos doentes tratados, foram abandonados pelos seus graves efeitos adversos, nomeadamente nefrotoxicidade, aplasia medular e hepatotoxicidade .

Mais recentemente, a utilização de anticorpos monoclonais anti-CD3 constitui outro exemplo de formas de intervenção terapêutica. O seu uso revelou alguma eficácia em estudos animais com redução de hiperglicémia em estadio precoce de diabetes e indução de tolerância em doença recorrente ⁽⁸⁾. Contudo, apesar de não possuírem efeitos acessórios relevantes, foram também abandonados, pela fraca eficácia observada no Homem.

Também a utilização de insulina administrada oralmente como forma de prevenção foi estudada. Em modelos animais, demonstrou levar à preservação da secreção endógena de insulina (quantificada pelo péptido C), assim como à redução dos níveis de HbA1c ⁽⁹⁾. No Homem, esta intervenção terapêutica não mostrou tais resultados. A administração de insulina oral não preveniu a diabetes tipo I ou retardou o seu aparecimento. Estudos com utilização de nicotinamida demonstraram um modesto efeito protector para a diabetes, tanto em animais como em humanos, assim como a preservação dos níveis de péptido C ⁽⁹⁾. Este antioxidante previne a morte de células β pancreática, pela repleção dos níveis de NAD inactivando a polimerase ribossómica evitando lesão do DNA. Como alternativa à terapêutica imunossupressora, a utilização de auto-antígenos como forma de induzir tolerância imunológica tem vindo a ser mais recentemente investigada.

Em doentes com diabetes *mellitus* tipo I os auto-antígenos *major* são a insulina e a isoforma 65-kD da descarboxilase do ácido glutâmico.

Os anticorpos anti-GAD, envolvidos no processo de insulite, sendo de fácil detecção, possuem elevada sensibilidade e especificidade. Surgindo na fase pré-clínica, constituem bons indicadores de futura insulino-pénia. Assim sendo, a sua detecção permite identificar indivíduos diabéticos tipo I em fase precoce de doença ainda com reserva insulínica, candidatos a beneficiar da utilização de uma intervenção terapêutica.

Baseado em estudos em modelos animais, a injeção com GAD sob a forma de vacina tem vindo a ser estudada, parecendo preservar a secreção residual de insulina sem ter os graves efeitos adversos das terapêuticas imunossupressoras. A vacina em estudo utiliza como substância activa uma isoforma de GAD65 numa formulação standardizada com alumínio sendo a sua administração por via sub-cutânea ⁽¹⁰⁾. Outras vias de administração como a oral e a intra-muscular estão a ser estudadas, pois o efeito profilático conferido pela resposta imune parece depender da via de administração da vacina ⁽¹¹⁾.

O seu mecanismo de acção baseia-se na indução de células T específicas que têm a capacidade de re-equilibrar o sistema imunitário resultando num efeito protector da função das células β .

Estudos em animais, demonstraram que a utilização de antígenos GAD, como forma de indução de tolerância aos anti-GAD, presentes no diabético, por si só preveniam ou retardavam a progressão para a hiperglicemia. No Homem no entanto, não se observou essa capacidade de prevenir ou retardar a progressão para a hiperglicémia, apesar do com-

provado aumento de múltiplas substâncias imunomoduladoras, nomeadamente citocinas citoprotectoras (Figura I). Constatou-se que se mantinha o declínio dos valores de péptido-C (proporcional à insulina secretada) não havendo redução dos valores de insulina diários necessários, como o inicialmente previsto ⁽¹⁰⁾.

No entanto, a vacina antigenica parece contribuir de forma importante para a preservação da insulina residual.

CONCLUSÃO

A diabetes tipo I é uma doença multifactorial complexa. Na sua história natural está bem estabelecida a reacção auto-imune dirigida contra constituintes do ilhéu. A destruição da célula β com redução progressiva da capacidade secretória de insulina é condicionada por factores genéticos e adquiridos.

Mais tarde, na evolução da doença a exposição crónica das células β à hiperglicemia condiciona efeitos tóxicos: inicialmente com disfunção das mesmas (com consequente alteração da insulino-secreção) e posteriormente contribuindo também para morte celular. Por este motivo, a intervenção terapêutica precoce constitui fonte de investigação actual fundamental.

Os avanços na compreensão da evolução da diabetes tipo I, a identificação bioquímica de auto-antígenos, incluindo a possibilidade de detecção precoce e o reconhecimento de agentes imunomoduladores estimularam o desenvolvimento de novas formas de abordagem terapêutica ⁽¹²⁾. A prevenção através da imunomodulação com vacina antigenica constitui uma abordagem de intervenção futura.

Com base nas suas características, os anticorpos anti-GAD têm ganho importância crescente ao permitir identificar can-

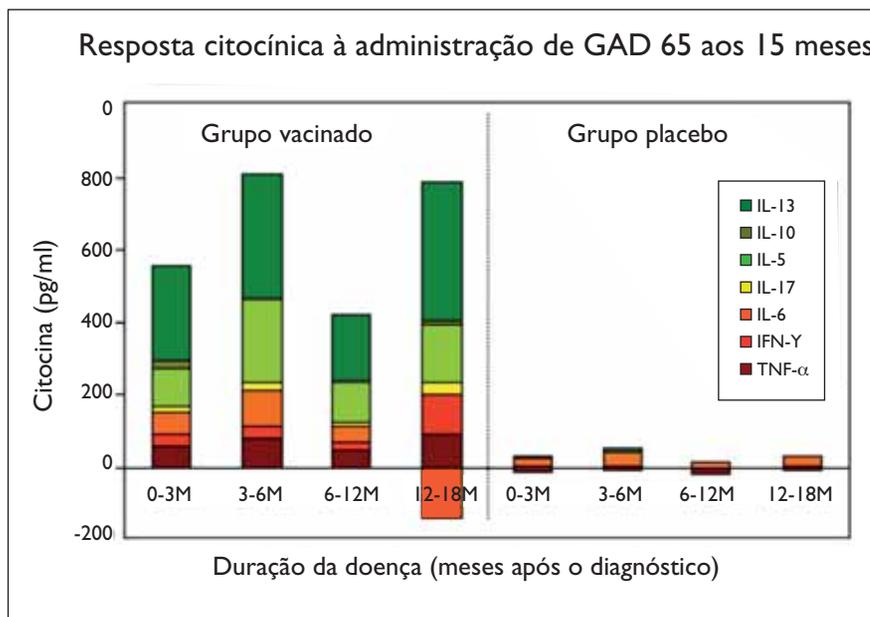


Figura I - Resposta imunológica de doentes a quem foi administrada a vacina (DiamydA). Foi demonstrada maior quantidade de citocinas protectoras (verde) no grupo de doentes tratados e maior quantidade de citocinas inflamatórias (vermelho) no grupo placebo. Adaptado de: M Faresjö, M Hedman, R Casas, S Axelsson, J Ludvigsson.

didatos à utilização de uma vacina com o objectivo de prevenção da doença.

Apesar de não estar demonstrada a reversão da diabetes tipo I, a vacina antigénica parece contribuir de forma importante para a preservação da insulina residual.

A regeneração de células pancreáticas tem sido também alvo de grande investigação. A capacidade de regeneração do pâncreas já conseguida em estudos animais constitui uma área de investigação recente no ser humano.

Nos doentes com diabetes tipo I a taxa de progressão da lesão imunológica é altamente variável. Este facto, levanta um dilema terapêutico: a intervenção num período pré-clínico é por um lado fundamental ao preservar um maior número de células β funcionantes, mas por outro poderá estar a ser utilizada em casos desnecessários. Nestes casos o tratamento de doentes com doença não progressiva pode até aumentar o risco de diabetes tipo I ao alterar o equilíbrio entre células T helper e T citotóxicas. Contudo, retardar a introdução de terapêutica em fase pré-clínica implica menor número de células β que ainda restam para preservar ⁽¹³⁾.

Apesar de todos os avanços na compreensão da patologia complexa da diabetes e na possibilidade de intervenção terapêutica a vários níveis, há que ter em conta que se trata de uma doença crónica do jovem que requer, a par da eficácia terapêutica, uma absoluta segurança a longo prazo.

BIBLIOGRAFIA

1. Esteves MC, Duarte R, Caldeira JL. Anticorpos anti-GAD. Indicações na prática clínica. *Medicina Interna*. 1998; 5(2): 117-21.
2. Faustman DL. Immunotherapy on Trial for New-Onset Type I Diabetes. *N Engl J Med*. 2008; 359: 1956-8.
3. Quadros CA. History and prospects for viral disease eradication. *Med Microbiol Immunol*. 2002; 191(2): 75-81.
4. Male D, Roitt I. Introdução ao Sistema Imune. In: Roitt I, Brostoff J, Male D, *Imunologia*. 5ª Edição, Mosby International Limited, 1ª Edição Brasileira, Editora Manole, São Paulo, 1999. pág. 11.
5. Beverly P. Vaccination. In: Roitt I, Brostoff J, Male D, *Imunologia*. 5ª Edição, Mosby International Limited, 1ª Edição Brasileira, Editora Manole, São Paulo, 1999, págs: 264-8.
6. Gradman AH, Pinto R. Vaccination: a novel strategy for inhibiting the rennin-angiotensin-aldosterone system. *Curr Hypertens Rep*. 2008; 10: 473-9.
7. Neves J. Vacina para diabetes recebe aprovação para iniciar ensaios de fase III na Europa. *Actualidades em Diabetes*, 2008.
8. Herold KC, Hagopian V, Auger JA, Poumian-Ruiz E, et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type I diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2002; 346(22).
9. Schatz DA. Prevention of Type I Diabetes Mellitus CME.
10. Ludvigsson J, Faresjo M, Hjorth M, et al. GAD Treatment and Insulin Secretion in Recent-Onset Type I Diabetes. *N Engl J Med*. 2008; 359(18).
11. Li AF, Escher A. Intradermal or oral delivery of GAD-encoding genetic vaccines suppresses type I diabetes. *DNA Cell Biol*. 2003; 22(4): 227-32.
12. Atkinson MA. Thirty years of Investigating the Autoimmune Basis for Type I Diabetes- Why can't we prevent or reverse this disease? *Medline*. 2005.
13. Skyler JS, Marks JB. Immune intervention in type I diabetes mellitus. *Diabetes Reviews*. 1993; 1: 15.

