

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Neurociências

Wagner José Martorina

**VARIABILIDADE GLICÊMICA EM PACIENTES COM *DIABETES MELLITUS*
TIPO 2 (DMT2): o papel da melatonina em um estudo crossover, duplo cego, placebo
controlado, randomizado.**

Belo Horizonte

2023

Wagner José Martorina

**VARIABILIDADE GLICÊMICA EM PACIENTES COM *DIABETES MELLITUS*
TIPO 2 (DMT2): o papel da melatonina em um estudo crossover, duplo cego, placebo
controlado, randomizado.**

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Neurociências

Orientador: Professor: Dr. Almir Ribeiro
Tavares Junior

Belo Horizonte

2023

043

Martorina, Wagner José.

Variabilidade glicêmica em pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2): o papel da melatonina em um estudo crossover, duplo cego, placebo controlado, randomizado [manuscrito] / Wagner José Martorina. – 2023.

116 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Professor: Dr. Almir Ribeiro Tavares Junior.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

1. Neurociências. 2. Diabetes Mellitus Tipo 2. 3. Melatonina. 4. Glicemia. I. Tavares Junior, Almir Ribeiro. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ATA DE DEFESA DE TESE DO ALUNO

WAGNER JOSÉ MARTORINA

Realizou-se, no dia 12 de setembro de 2023, às 14:00 horas, Sala de Seminários G4-23, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 102ª defesa de tese, intitulada *VARIABILIDADE GLICÊMICA EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DMT2): O PAPEL DA MELATONINA EM UM ESTUDO CROSSOVER, DUPLO CEGO, PLACEBO CONTROLADO, RANDOMIZADO.*, apresentada por WAGNER JOSÉ MARTORINA, número de registro 2019710069, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em NEUROCIÊNCIAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Almir Ribeiro Tavares Junior - Orientador (UFMG), Prof. Hani Camille Yehia (UFMG), Profa. Maristela de Oliveira Poletini (UFMG), Profa. Maria Paz Loyza Hidalgo (UFRGS), Profa. Fernanda Gaspar do Amaral (UNIFESP), Prof. Paulo Augusto Carvalho Miranda (UnBH).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 12 de setembro de 2023.

Carlos Magno Machado Dias - Secretário

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Prof. Almir Ribeiro Tavares Junior (Doutor)

Prof. Hani Camille Yehia (Doutor)

Prof. Maristela de Oliveira Poletini (Doutor)

Profa. Maria Paz Loayza Hidalgo (Doutora)

Profa. Fernanda Gaspar do Amaral (Doutora)

Prof. Paulo Augusto Carvalho Miranda (Doutor)



Documento assinado eletronicamente por **Hani Camille Yehia, Professor do Magistério Superior**, em 12/09/2023, às 17:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=2808526&infra_sistema...

31/10/2023, 16:16

SEI/UFMG - 2601336 - Ata de defesa de Dissertação/Tese



Documento assinado eletronicamente por **Maria Paz Loayza Hidalgo, Usuária Externa**, em 13/09/2023, às 14:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maristela de Oliveira Poletini, Professora do Magistério Superior**, em 14/09/2023, às 11:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Augusto Carvalho Miranda, Usuário Externo**, em 17/10/2023, às 18:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Almir Ribeiro Tavares Junior, Professor Magistério Superior - Voluntário**, em 19/10/2023, às 10:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Gaspar do Amaral, Usuária Externa**, em 26/10/2023, às 17:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2601336** e o código CRC **8EEDD183**.

À Minha mãe Ana Amélia de Souza e à minha esposa Luciana Charchar por serem o motivo e o sentido de tudo.

Agradecimentos

Agradeço ao Dr. Almir Tavares pelos ensinamentos e orientação próxima e repleta de espírito e entusiasmo acadêmico e, também, pela amizade demonstrada durante quase 10 anos de convivência semanal, no mestrado e agora no doutorado. Agradeço à minha esposa Luciana Charchar Vilas Boas Cruz, por ser meu porto seguro e ter me incentivado e acreditado nessa conquista assim como em todas outras da minha vida. Agradeço à minha mãe por ser fonte de inspiração para que eu sempre avance um pouco mais em todos aspectos da minha vida. Agradeço aos amigos da Banda Teto Vinil por serem fonte de renovação e bem estar psicológico fundamental para essa árdua jornada. Agradeço aos meus amigos Frederico Savassi e Viviani Sette pela amizade sincera e renovadora tão difícil e tão importante nos dias atuais. Agradeço à Pia, ao Eduardo e ao Loop pelo apoio e carinho de sempre. Agradeço aos membros da secretaria do programa de neurociências da UFMG por todo acolhimento técnico ao longo desses anos. Por fim, meu agradecimento a todos pacientes que participaram desse trabalho e doaram um pouco do seu tempo e disponibilidade em favor da ciência, e, também, de cooperação com meus objetivos acadêmicos e de vida.

“O tempo é uma ilusão. A única razão para o tempo existir é para que tudo não aconteça de uma vez”.

Albert Einstein

Resumo

O diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) é uma doença caracterizada por hiperglicemia crônica. A melatonina é um hormônio que sinaliza a fase de claro e escuro e tem papel fundamental nos ritmos biológicos. Estudos prévios têm demonstrado que pacientes com DMT2 apresentam deficiência na produção de melatonina. O papel dessa substância na hiperglicemia de pacientes com DMT2 vem sendo amplamente estudado. Entretanto, acreditamos que a melatonina possa influenciar mais o ritmo circadiano de variação da glicose do que a sua média. Neste trabalho procuramos avaliar se a suplementação de 3mg de melatonina às 21:00 poderia reduzir a variação da glicemia capilar de pacientes com DMT2. Para isso, elaboramos um estudo crossover, duplo cego, placebo controlado e randomizado. 30 pacientes participaram desse estudo. 15 deles seguiram a sequência de intervenção: placebo (7 dias) - washout (7 dias) - melatonina (7 dias), e outros 15: melatonina (7 dias) - washout (7 dias) - placebo (7 dias). Nos dias 5, 6 e 7 da primeira e da terceira semana os pacientes aferiram glicemias capilares pré e pós prandiais, um total de 6 aferições ao dia. No sétimo a variação absoluta entre as glicemias pré e pós prandiais do café da manhã foi maior quando os pacientes usaram a melatonina. Além disso, a amplitude da variação glicêmica entre o pós jantar do sexto dia e o jejum do sétimo dia foi maior quando os pacientes usaram a melatonina. Há duas formas teóricas de explicar o primeiro resultado: a melatonina inibi receptores celulares acoplados à proteína G durante o período noturno. Pela manhã, após a queda dos seus níveis séricos, essa via intracelular, poderia tornar-se hipersensibilizada e aumentar bruscamente a produção de hormônios contrarreguladores da insulina. Outra possível explicação para esse resultado é o possível efeito residual da melatonina exógena pela manhã, que pela inibição da insulina pode gerar uma resposta hiperglicêmica à dieta. O segundo resultado desse trabalho pode ser explicado pelos efeitos prospectivos distais da melatonina. A melatonina age diretamente na supressão da atividade do complexo Clock/Bmal1. Um efeito inibitório prolongado sobre este complexo poderia levar a uma sincronização anormal, errática, no relógio biológico e na amplitude glicêmica. Este estudo concluiu que o uso de melatonina a curto prazo pode alterar a variabilidade glicêmica de pacientes com DMT2. Futuros estudos, de mais longo prazo são necessários para investigar o papel desse hormônio na variabilidade glicêmica desses pacientes. Palavras-chaves: diabetes, melatonina, variabilidade glicêmica, crossover

Abstract

Type 2 diabetes mellitus (DMT2) is a disease characterized by chronic hyperglycemia. Melatonin, a hormone that signals the phase of our circadian rhythm, plays a key role in biological rhythms. Previous studies have shown that patients with DMT2 have a deficiency in the production of melatonin. The role of this substance in the hyperglycemia of patients with T2DM has been widely studied. However, we believe that melatonin may influence the circadian rhythm of glucose variation more than its average. In this work, we tried to evaluate whether the supplementation of 3mg of melatonin at 21:00 could reduce the variation of capillary glycemia in patients with T2DM. For this, we designed a crossover, double blind, placebo controlled and randomized study. 30 patients participated in this study. 15 of them followed the intervention sequence: placebo (7 days) - washout (7 days) - melatonin (7 days), and another 15: melatonin (7 days) - washout (7 days) - placebo (7 days). On the 5th, 6th and 7th days of the first and third week, the patients measured pre- and postprandial capillary glycemia, a total of 6 measurements per day. In the seventh, the absolute variation between pre- and post-prandial breakfast glucose levels was greater when patients used melatonin. In addition, the range of glycemic variation between the sixth day after dinner and the seventh day fasting was greater when patients used melatonin. There are two theoretical ways to explain the first result: Melatonin inhibits G protein-coupled cellular receptors during the night. In the morning, after the drop in serum levels, this intracellular pathway could become hypersensitive and suddenly increase the production of insulin counter-regulatory hormones. Another possible explanation for this result is the possible residual effect of exogenous melatonin in the morning, which, by inhibiting insulin, can generate a hyperglycemic response to the diet. Melatonin acts directly to suppress Clock/Bmal1 complex activity. A prolonged inhibitory effect on this complex could lead to abnormal, erratic synchronization in the biological clock and glycemic amplitude. This study concluded, therefore, that the short-term use of melatonin can alter the glycemic variability of patients with T2DM. Future, longer-term studies are needed to investigate the role of this hormone in the glycemic variability of these patients.

Keywords: diabetes, melatonin, glycemic variability, crossover

SUMÁRIO

1 Introdução	5
2. Revisão da literatura	9
2.1 A melatonina endógena	9
2.2 A melatonina exógena	18
2.3 Melatonina e o efeito Carry over em estudos crossover.....	19
2.4 A variabilidade glicêmica.....	19
2.5 Variabilidade glicêmica e estudos crossover	21
3 Materiais e métodos	21
4 Resultados	30
5 Discussão.	37
6 Conclusão	41
Referências	42
Anexos	47
Apêndices	52

1 Introdução

O *diabetes mellitus tipo 2* (DMT2) é uma doença caracterizada por hiperglicemia, e, que se não adequadamente tratado, pode levar à complicações agudas e crônicas como amaurose, amputações de membros inferiores e insuficiência renal [1]. As tecnologias para avaliar o controle da doença foram evoluindo ao longo do tempo. No final do século XIX Bouchardat desenvolveu o primeiro método para essa avaliação. Consistia em fitas reagentes que verificavam a presença de glicose na urina. Esse método, apesar de inovador, não permitia a avaliação de eventuais hipoglicemias, era impreciso e, portanto, pouco ajudava no estabelecimento das metas do que seria um bom controle glicêmico. Foi somente no século XX que surgiram as fitas reagentes para análise da glicemia capilar. Essa ferramenta também apresentava imprecisões, mas evoluiu ao ponto de tornar-se o principal parâmetro para a definição das metas glicêmicas capazes de prevenir as complicações crônicas da doença [2].

O surgimento da glicohemoglobina (HbA1C) em 1970 foi um marco na definição do controle glicêmico de pacientes com *diabetes mellitus*. Essa molécula era capaz de prever a média das glicemias dos últimos três meses [2]. Os valores de HbA1C, dados em porcentagem, são influenciados principalmente pelas glicemias do último mês [3]. Essa nova ferramenta foi analisada por grandes estudos para se estabelecer uma meta no tratamento. Esses trabalhos mostraram que uma HbA1C inferior a 7% se correlacionava bem com a redução de desfechos microvasculares (retinopatia diabética, nefropatia diabética, neuropatia diabética)[4-7]. Em relação aos desfechos macrovasculares os resultados não foram tão consistentes assim. Alguns estudos como o ACCORD[7], por exemplo, demonstraram inclusive o contrário, que o controle estrito da glicemia poderia resultar em aumento do risco cardiovascular.

Um problema associado ao uso exclusivo da HbA1C para avaliação do *status* glicêmico de um paciente está na própria natureza da informação dada por essa molécula. Ela constitui uma média das várias glicemias capilares dos últimos três meses. Se em pacientes estáveis do ponto de vista glicêmico, esse dado pode ser confiável, naqueles instáveis, que ora apresentam hiperglicemia e ora hipoglicemias, teremos a falsa impressão de bom controle [8].

Há dois tipos de variabilidade glicêmica: a de curto prazo, objeto desse trabalho, que pode ser obtida por glicemias intra e inter dias, e a de longo prazo, que considera semanas a

meses e é dada pela HbA1C. A variabilidade glicêmica de curto prazo pode ser crítica o suficiente para expor um determinado paciente aos efeitos deletérios da hiperglicemia, e, ao mesmo tempo, aos efeitos deletérios da hipoglicemia. Entretanto, uma variabilidade glicêmica menos ampla, também, pode mostrar-se deletéria. Estudos recentes têm corroborado a hipótese de que uma determinada amplitude de variação glicêmica ao longo do dia, mesmo estando o nadir e o ápice da glicemia na meta, pode contribuir para complicações crônicas microvasculares no DMT2, tal qual ocorre com a hiperglicemia crônica [9, 10]. A variação média da glicemia acima de 50mg/dl ou o correspondente a 1/3 da média dada pela HbA1C pode ser considerada uma variação inadequada da glicemia capilar [11]. Essa visão tem sido incorporada aos novos tratamentos para DMT2 [12]. Um dos principais objetivos dos novos fármacos é exatamente a superioridade em termos de variabilidade glicêmica. Insulinas ultra-lentas, sem pico de ação ou ultra rápidas que são rapidamente metabolizadas após a queda da glicemia e drogas como inibidores da dipeptidil peptidase IV que atuam na glicemia pós prandial através do estímulo à liberação de insulina, apenas em momentos onde há o consumo de alimentos, são alguns exemplos [13, 14]. É fato que os grandes laboratórios tentam agir em duas frentes com essas medicações: redução dos episódios de hipoglicemia e menor variabilidade glicêmica.

Se por um lado há fatores extrínsecos, como o próprio tratamento, associados à variabilidade glicêmica, há também fatores intrínsecos, relacionados ao indivíduo. Aqueles mais óbvios compreendem a dieta e a atividade física. Se o indivíduo varia a forma como ele se alimenta ao longo do dia, haverá uma maior oscilação da glicemia. O mesmo ocorre com oscilações na frequência e intensidade da atividade física. Outros fatores como a presença de lipohipertrofia, má adesão ao tratamento, oscilação do estado emocional, também entram nessa lista [15, 16]. Um importante aspecto que pode estar relacionado à variabilidade glicêmica é o tipo de cronótipo do paciente. Indivíduos vespertinos apresentam hábitos noturnos de dieta e outras atividades e, também, início tardio da secreção de melatonina, que pode interferir diretamente na oscilação circadiana da glicemia de pacientes com DMT2 [17].

Ainda sobre a variabilidade glicêmica, dever-se-a considerar que em indivíduos com DMT2 ela está aumentada em relação a indivíduos sem a doença [18]. Como explicar essa condição? Trabalhos prévios têm associado alterações na produção da melatonina a um maior

risco de desenvolver diabetes mellitus tipo 2 [19]. Um desses estudos mostrou que indivíduos com pré diabetes e elevada resistência à insulina excretam quantidades menores de metabólitos da melatonina na urina (6-sulfamatoximelatonina)[20]. Há também estudos de associação do polimorfismo do gene que expressa receptores MTNR1B da melatonina com aumento do risco de desenvolver DM2 e distúrbios circadianos. Essa mutação pode levar a um atraso no início da produção de melatonina [21, 22]. Estudos prévios têm verificado que níveis elevados de melatonina em horários próximos às refeições predis põem a uma elevação inadequada da glicemia pós prandial ou pós dextrosol [23-25]. Diversos estudos têm explorado a relação da melatonina com o controle glicêmico de pacientes com DM2 [26]. Trabalhos sobre a influência do cronótipo no controle glicêmico de pacientes com DM2 têm associado a vespertinidade à piora da glicohemoglobina. Indivíduos com esse cronótipo apresentam início e queda tardia da secreção de melatonina [25]. Outros estudos têm avaliado o papel da melatonina exógena na mudança dos valores de HbA1C [27], ou seja, na variabilidade glicêmica de longo prazo. Os resultados têm sido conflitantes. Em alguns trabalhos a melatonina melhorou a HbA1C, em outros não houve diferença e em outros houve piora desses valores [27, 28]. Uma explicação para esses achados seria a presença ou não do polimorfismo dos receptores de melatonina MTNR1B. O uso de melatonina em pacientes que apresentam esse polimorfismo parece piorar o controle glicêmico [24]. Outra explicação para essas divergências estaria relacionada a diferentes doses e diferentes horários em que a melatonina foi usada nesses trabalhos. Soma-se a isso o fato de que o tempo de uso de melatonina foi diferente nos diversos trabalhos [29]. Em todos esses estudos, há a seguinte premissa: se pacientes com DM2 apresentam evidências de insuficiência de produção de melatonina, a sua reposição poderia corrigir essa deficiência e ao mesmo tempo ter algum benefício no controle glicêmico visualizado através da molécula de HbA1C. Há uma lógica interessante nesse raciocínio. Estudos recentes têm associado o mal controle do diabetes mellitus a distúrbios do sono. A associação americana de diabetes, em 2017, passou inclusive a recomendar a abordagem do sono de pacientes com diabetes mellitus[30]. Sabe-se que a melatonina é um hormônio implicado no sono. Estaria, portanto, a deficiência de melatonina implicada na fisiopatologia da hiperglicemia e dos distúrbios do sono nesses pacientes?

A melatonina é um hormônio que sinaliza endogenamente a fase de claro e escuro do ritmo circadiano. O ritmo não somente relacionado aos horários de dormir e acordar, mas

também o ritmo de fome, saciedade, maior vigília e disposição para atividades durante o dia [31]. Uma hipótese para relacionar a melatonina ao DMT2 é a de que ela estaria implicada em determinar o ritmo em que a nossa glicemia varia ao longo do dia. A sua produção noturna estaria assim implicada na programação diurna do ritmo de hormônios como a insulina e, também, cortisol, hormônio do crescimento, catecolaminas, que fazem o papel de contra regulação da insulina, aumentando a resistência à insulina e estando, portanto, relacionados à amplitude da variação da glicemia. Esse raciocínio é corroborado pelos estudos que demonstraram que a relação da melatonina com a glicemia depende de fatores relacionados ao ritmo circadiano: cronótipos, horário de uso, ações diferentes no metabolismo glicêmico conforme sua concentração e fase do ritmo circadiano.

Nos últimos anos houve um grande entendimento dos mecanismos de hiperglicemia de pacientes com DMT2. À resistência à insulina e à deficiência de secreção de insulina pela célula beta pancreática somaram-se o aumento da reabsorção tubular de glicose, e, também, a deficiência de produção de hormônios incretínicos pelo intestino, para explicar a hiperglicemia [32]. A deficiência de melatonina poderia ser mais uma dessas vias hiperglicêmicas. O papel da melatonina no controle glicêmico, entretanto, parece equivocado. Essa afirmação pode ser corroborada pela divergência dos estudos entre melatonina e HbA1C e como já discutido, pelo papel principal, desempenhado por esse hormônio: regulação do ritmo circadiano [33, 34]. Neste ponto, voltamos, ao que dissemos em parágrafos anteriores: é possível que o papel da melatonina esteja mais associado à variabilidade, ao ritmo da glicose, do que ao controle glicêmico.

É preciso entender bem a fisiologia da melatonina endógena e, também, a farmacologia da melatonina exógena para relacioná-la ao ritmo da glicose ao longo do dia. Diante da panaceia do uso da melatonina estudos experimentais que apresentam maior nível de evidência são necessários, afim de avaliar se a exposição da população a essa substância poderia gerar eventuais riscos. Alguns autores têm feito uma comparação da melatonina com a vitamina D[35]. Não somente pelo uso disseminado e indiscriminado, mas também pela semelhança de suas ações. Se por um lado a melatonina é uma molécula do escuro, da noite, a vitamina D é a molécula do claro, do dia. Ambas apresentam ações em receptores específicos e ações não relacionadas a receptores. Além disso o uso clínico da melatonina tal qual a vitamina D tem

sido explorado em diversas comorbidades: demência, doenças autoimunes, infecção por covid, fertilidade, câncer, autismo, ovário policístico, osteoporose, diabetes mellitus e outros [35]. O conhecimento clínico sobre o papel da vitamina D entretanto, ainda é maior do que o da melatonina.

Outro ponto importante neste estudo é a definição do conceito de variabilidade glicêmica. Há diversas formas para avaliar se um paciente apresenta variação anormal de sua glicemia ou não. Essas diferenças podem ser simplesmente conceituais, baseadas em cálculos matemáticos diversos ou, então, tecnológicas, pois há diferentes formas de se aferir a glicemia de um paciente, algumas usando tecnologias de ponta, com altos custos [36].

Afim, de avaliarmos se melatonina exógena apresenta um papel na variabilidade glicêmica de pacientes com DMT2, desenvolvemos um estudo crossover, duplo cego, placebo controlado e randomizado. Antes de detalharmos o desenho do trabalho, será abordado alguns conceitos como: variabilidade glicêmica e as características da melatonina endógena e exógena.

2 Revisão da literatura

2.1 A melatonina endógena

Em 1958 foi isolada da glândula pineal de bovinos a N-acetil-5 metoxitriptamina, que por ter ação na agregação de grânulos de melanócitos e derivar da serotonina passou a chamar-se melatonina [37]. A descoberta de que a melatonina era secretada principalmente durante a noite e regulada pelo ciclo claro / escuro colocou essa substância no centro da sinalização do ritmo circadiano. É fato, que outros tecidos, também, são capazes de produzir a melatonina, entretanto, os seus níveis séricos são determinados, principalmente pela produção da glândula pineal [37]. A melatonina é secretada pela pineal no sistema vascular e, também, no líquido cefalorraquidiano [38], entretanto, a concentração de melatonina em outros tecidos é superior a concentração vascular, demonstrando a importância da produção extra pineal. A regulação do ritmo circadiano, entretanto, relaciona-se mais a melatonina pineal do que aquela produzida periféricamente. Periféricamente a melatonina parece ter uma ação parácrina, anti-oxidante, não relacionadas à sua ligação a um receptor específico [37].

A formação da melatonina inicia-se com a molécula de triptofano. Esta sofre a ação da triptofano-hidroxilase para formar a 5 hidróxi-triptofano. Esta substância então, sofre a ação da descarboxilase L-amino-ácido e forma a molécula de serotonina. Esta por sua vez sofre a ação da N-acetil-transferase aril-alquilamina e forma a N-acetil-serotonina. Por fim, a ação de uma metil-transferase sobre essa última substância leva à formação da melatonina. A ação dessas enzimas, principalmente a N-acetil-transferase aril-alquilamina é maior no período noturno e há correspondência com os níveis de melatonina séricos [39]. A regulação dessa cascata enzimática ocorre através de uma via neural. Células ganglionares fotossensíveis da camada interna da retina são moduladas pelo ciclo claro/ escuro. Durante a noite essas células ativam projeções para o núcleo supra quiasmático. Este, envia projeções ao hipotálamo, segmento intermédio lateral da medula, alcançando o gânglio cervical superior de onde fibras pós-sinápticas simpáticas chegam à glândula pineal, liberando norepinefrina que se liga a alfa e beta receptores, e estimula a produção de melatonina. A inibição da melatonina se dá, quando há um estímulo luminoso, principalmente no comprimento de faixa da luz azul. Este comprimento de onda, ativa a mesma via neural que também é capaz de inibir a via simpática que chega à pineal [38]. A eficácia dessa sinalização é imediata, pois ao contrário de outras glândulas do sistema endócrino, a pineal não armazena o seu hormônio, a melatonina, e, portanto, a redução de sua concentração plasmática inicia-se logo após o estímulo luminoso, como um relógio. Após início da produção noturna de melatonina há um pico em torno de 3:00 a 4:00 da madrugada, podendo isso variar com o cronótipo [40]. Neste momento há redução da temperatura corporal e da pressão arterial e maior sonolência. Fatores como exposição à luz durante a noite, idade e heterogeneidade da atividade das enzimas que regulam a produção de melatonina, podem alterar o horário, a amplitude do pico e a produção total de melatonina. A variabilidade quanto à produção de melatonina pode ser grande entre dois indivíduos, porém a variabilidade em um mesmo indivíduo em dias diferentes é pequena [40].

A melatonina endógena apresenta dois tipos de ações: imediatas e prospectivas. Os efeitos imediatos da melatonina ocorrem no momento que ela está presente, durante a noite e podem ser relacionados a sua ação em receptores de melatonina ou não. Já os efeitos prospectivos, dependem da melatonina no período noturno, mas ocorrem no dia seguinte, quando ela não está mais presente. Os efeitos prospectivos podem ser de dois tipos: proximais e distais. O efeito prospectivo proximal relaciona-se a uma hipersensibilidade da via da adenil

ciclase/cAMP/PKA/CREB após o efeito inibitório da melatonina sobre o receptor de proteína G terminar pela manhã. Esse mecanismo pode gerar hipersecreção de hormônios ligados a esta via, inibida durante a noite. O efeito prospectivo distal está associado a regulação de expressão de genes, proteínas de translação e degradação, envolvendo a maquinaria de genes relógio [38].

Vários trabalhos têm explorado a ação da melatonina na secreção dos hormônios pituitários. Alguns desses trabalhos mostram que o padrão de secreção de gonadotrofinas, hormônio de crescimento, cortisol, vasopressina e hormônio tireo-estimulante podem ser afetados diretamente pela secreção noturna da melatonina [41-43]. Uma possibilidade é de que o ritmo de secreção desses hormônios poderia estar alterado em pacientes com alterações na amplitude ou no ritmo de secreção de melatonina. Essa possibilidade corrobora uma possível explicação para a associação entre variabilidade glicêmica e alterações da secreção de melatonina. Isso, porque praticamente todos os hormônios hipofisários apresentam uma ação hiperglicemiante, através do aumento da resistência à insulina. Uma alteração na fisiologia dessa secreção poderia influenciar o ritmo de elevação e queda das glicemias, ou seja, do ritmo circadiano da variabilidade glicêmica. Soma-se a isso o fato de que a melatonina pode ter efeito direto na secreção de insulina e na resistência a ação da insulina [44-47]. Trabalhos prévios têm mostrado a presença de receptores de melatonina nas células beta pancreática e alterações ligadas à resistência à insulina após uso exógeno da melatonina [46, 48].

As ações da melatonina endógena aqui descrita são exercidas através de sua ligação aos receptores MT1 e MT2. Entretanto, diferente de outros hormônios que apresentam sítios específicos de ação, a melatonina pode apresentar ações não receptores específicas [40]. O papel da melatonina como substância anti-inflamatória também tem sido extensivamente estudado [49]. Esse papel parece ser exercido principalmente pela melatonina produzida por outros tecidos, diferentes da pineal [50]. Através de uma ação parácrina é preconizado que a melatonina exerça esse tipo de ação [50]. O papel desse hormônio em doenças inflamatórias e até mesmo na prevenção do surgimento de neoplasias tem sido estudado em função disso [51].

Os exatos mecanismos pelos quais a secreção de melatonina no período noturno determina os ritmos circadianos ao longo do dia ainda não estão completamente esclarecidos. Houve uma grande evolução no entendimento da fisiologia desse hormônio, mas o fato da glândula pineal apresentar uma regulação, feedback e ações diferentes de outras glândulas ainda impõe desafios a esse entendimento.

2.1.1 Outras ações da melatonina

2.1.1.1 Melatonina e câncer

Há uma série de evidências apontando que a melatonina apresenta uma ação oncostática. Em doses farmacológicas ou fisiológicas a melatonina exibe uma atividade inibitória do crescimento em células com receptores de estrogênio e linhagens de células do câncer de mama. Esse papel parece estar associado a uma elevação da glutathione promovida pela melatonina. A glutathione é um poderoso antioxidante endógeno que neutraliza espécies reativas em oxigênio. Em hepatomas a melatonina tem a capacidade de inibir a captação do ácido graxo linoleico, cujo metabolismo leva à formação de substâncias tóxicas que promovem dano celular. Essa ação ocorre a partir dos receptores MT1 e MT2. Além da ação inibitória na evolução tumoral a melatonina apresenta uma ação preventiva através da neutralização de radicais livres que poderiam agredir o DNA humano. O papel da melatonina na oncogênese ainda está sendo definido [34, 37].

2.1.1.2 Ação imunomoduladora

Estudos prévios têm demonstrado que a melatonina apresenta funções na regulação do sistema imunológico. A Melatonina exógena, por exemplo, parece oferecer proteção contra imunodeficiências causadas por eventos estressantes, drogas e contra encefalite viral. O estímulo à produção de IL2, regulação da célula T helper e aumento do número de células CD4 pode explicar essas ações da melatonina, além de sua atividade anti-inflamatória. Esse estímulo imunológico da melatonina pode ser verificado também em casos de artrite reumatoide, em que foi constatado uma elevação dos níveis dessa substância durante o período noturno. A maior prevalência de doenças autoimunes em regiões de altas latitudes corrobora essa hipótese, dada as extensas horas das noites de inverno nessas regiões e, portanto, maior exposição à melatonina endógena [34].

2.1.1.3 Ação na depressão

Estudo prévios têm associado níveis baixos de melatonina a quadros depressivos e a distúrbios bipolares. Nestes pacientes os níveis e a amplitude da secreção de melatonina encontram-se reduzidos. Teste laboratoriais com combaias knockout em relação ao receptor

MT1 mostram que essa linhagem apresenta comportamento indicativo de depressão, o que demonstra a importância desse receptor no quadro de depressão. Outro dado sobre a importância da melatonina na depressão pode ser observado na elevação dos níveis séricos de melatonina após tratamento com antidepressivos. Soma-se a isso os estudos que mostraram superioridade da agomelatina em relação ao placebo na melhora dos sintomas depressivos. A agomelatina é um agonista dos receptores MT1 e MT2 de melatonina [34].

2.1.1.4 Ações no trato gastrintestinal

Através dos receptores MT1 a melatonina estimula a secreção de bicarbonato no trato gastrintestinal. Esse fato parece importante para a proteção do intestino contra a ação corrosiva dos ácidos produzidos no estômago. Alguns estudos demonstraram inclusive uma relação inversa entre a presença de úlceras gastrintestinais e a níveis de melatonina. Estudos com uso da melatonina 3 mg por semana por 8 semanas mostrou melhora similar dos sintomas de pacientes com úlceras quando comparado ao omeprazol. Em outros estudos a melatonina conseguiu melhorar sintomas da síndrome do intestino irritável com uso de baixas doses , 0,3 mg [34, 35].

2.1.1.5 Ações no sistema cardiovascular

A melatonina atua no sistema cardiovascular reduzindo o tônus adrenérgico, pela redução dos níveis de noradrenalina e aumento do tônus vagal. A administração de melatonina reduz tanto a pressão arterial diastólica, quanto a sistólica. O efeito vasodilatador da melatonina está associado aos receptores MT1 e o efeito vasoconstritor aos receptores MT2. O equilíbrio da ação desses receptores é fundamental para prevenção da hipoperfusão cerebral. Outros estudos têm mostrado que a melatonina melhora na função endotelial de pacientes com insuficiência cardíaca. Melhora nos níveis de LDL também têm sido verificado pelo uso de melatonina [34, 35].

2.1.1.6 Ações no osso

A melatonina atua no osso levando à diferenciação do pré osteoblasto em osteoblasto. Uma vez diferenciada essa célula iniciar a produção de proteínas da matriz óssea. Além disso a melatonina inibe a reabsorção óssea pela inibição do osteoclasto através do down regulation

do receptoru Kb, associado à ativação dessas células. Estudos em cobaias ooforectomizadas verificaram que a melatonina atuava de forma preventiva no remodelamento ósseo causado pela deficiência de estrogênio [34, 35].

2.1.1.7 Ações na função reprodutiva

A melatonina tem mostrado levar a um down regulation do GnRH. Esse efeito inibitório ocorre através dos receptores MT1, MT 2 e receptores órfãos nucleares ROR gama. As ações da melatonina no sistema reprodutivo, entretanto dependem da espécie e, também, da estação do ano. Em algumas espécies de animais a melatonina pode estimular a reprodução dependendo da época do ano (geralmente no verão) Em seres humanos foi verificado um pico melatonina a noite no décimo dia do ciclo menstrual, durante o inverno, coincidente com o pico de hormônio luteinizante. A maturação sexual também parece relacionada à melatonina. Foi observado que a queda dos níveis de melatonina coincide com a atividade pulsátil do GnRH que desencadeia a produção de hormônios sexuais e o início da puberdade [34, 35].

2.1.1.8 Ações no Stress oxidativo e atividade inflamatória

A melatonina reduz várias substâncias inflamatórias como TNF alfa, proteína C reativa e IL-6. Estudos com melatonina têm sido realizados em doenças neurodegenerativas que têm o stress inflamatório como componente básico de sua fisiopatologia. Na doença de Alzheimer e doença de Parkinson a administração de melatonina reduziu vários componentes inflamatórios em estudos com modelos animais. Estudos em seres humanos já foram realizados com resultados positivos, mas outros trabalhos necessitam ser realizados para avaliar melhor o papel da melatonina nesse contexto [34, 35]

2.1.1.9 Ações metabólicas da melatonina

A melatonina atua em vários tecidos e órgão responsáveis pelo metabolismo glicêmico. Estudos sobre a ação da melatonina na célula beta pancreática tem apresentado resultados contraditórios. Em alguns trabalhos a melatonina aumentou a secreção de insulina pela célula beta pancreática e em outros houve piora da secreção. Essa divergência tem diferentes explicações. Em vários trabalhos, quando a melatonina foi usada por curto período de tempo, houve piora dos níveis glicêmicos e quando usada por um tempo prolongado houve melhora da

glicemia. Uma explicação possível para isso deve -se ao fato de que a melatonina usada a longo prazo apresenta efeitos protetores e em relação à célula beta pancreática inibindo inclusive a apoptose celular. Há também, a presença ou não do polimorfismo do receptor MTNR1B da melatonina que determina piora da glicemia após o seu uso, que pode determinar resultados diferentes em populações distintas. Outra questão deve -se à via em que a melatonina atua no seu tecido alvo. A ação da melatonina nos receptores MT1 e MT2 leva a inibição da liberação de insulina. Nos receptores MT1 a melatonina inibe o AMP cíclico com redução da exocitose dos grânulos de insulina e nos receptores MT2 há inibição do GMP cíclico com inibição posterior dos grânulos de insulina. Por outra via porém o estímulo da melatonina sobre o IP3 aumentou o influxo de cálcio e assim liberação de insulina. Alternativamente, sinalização na via do receptor MT2 estimula a fosfolipase via proteínas Gq, com elevação do fosfato de Inositol que por fim aumenta a fusão das vesículas de insulina e portanto, determinado maior liberação da insulina. Claramente a melatonina pode ter ações em diferentes vias e impactar o metabolismo de forma diversa. A prevalência da ação em uma via sobre depende de fatores ainda desconhecidos [52].

Sobre a ação da melatonina no tecido adiposo, estudos prévios têm demonstrado que a pinealectomia de cobaias gera hiperglicemia pelo aumento da resistência à insulina e prejuízo da função da célula beta pancreática. A reposição de melatonina nesses trabalhos gerou uma recuperação desses parâmetros metabólicos. A gênese da resistência à insulina causada pela ausência de melatonina está na redução do GLUT 4, que são transportadores de glicose dos tecidos. Essa redução ocorre no tecido adiposo marron, branco e nos músculos [53].

2.1.1.10 Ritmo circadiano da glicose

A glicemia e a insulina apresentam um ciclo circadiano semelhante. Isso ocorre, pois a elevação da insulina ocorrerá exatamente em momentos em que a glicemia estiver mais elevada ou encontrando maior resistência para passar para o meio intra-celular. Durante a noite há uma queda na produção de insulina. O único estímulo para a produção de insulina neste horário é a produção hepática de glicose, pois teoricamente não há a presença da dieta. Nos hepatócitos a enzima glicogênio sintetase estimula gliconeogênese, mantendo os níveis glicêmicos fisiológicos no período noturno. Quando esses níveis começam a aumentar, a insulina inibe a ação dessa enzima impedindo a hiperglicemia. Os níveis de melatonina noturnos encontram-se

elevados em relação ao dia. Estudo com combaias tem verificado que a pinealectomia determina hiperglicemia noturna, mostrando que a melatonina participa ativamente do padrão glicêmico noturno. Durante a manhã ocorre uma elevação dos níveis de glicemia. Este horário é marcado pela presença de pico dos hormônios contrarreguladores da insulina como, hormônio do crescimento, cortisol e catecolaminas. Essa elevação é mediada pelo efeito prospectivo proximal da melatonina. Por esse mecanismo a melatonina durante a noite inibe vias intracelulares responsáveis pela produção desses hormônios. Pela manhã com a redução dos níveis de melatonina essas vias tornam-se hipersensibilizadas, levando a um brusco aumento dos hormônios citados. Ao longo do dia o cortisol cai chegando a valores baixos durante o período noturno. A secreção de insulina ao longo do dia aumenta em um ritmo determinado pela dieta e pela atividade física. Se não houver variação da dieta e atividade física, a tendência é que haja uma menor elevação da glicemia à medida que nos afastamos do café da manhã. Refeições em períodos noturnos, porém quando já há uma maior concentração da melatonina podem determinar uma elevação tão alta da glicemia quanto aquelas do período da manhã. Esse fato pode ser verificado em estudos onde foi usada a melatonina exógena durante o dia, e, também a noite. Esse efeito pode estar associado a diversos fatores como: dose de melatonina não fisiológica e presença de mutações em receptores de melatonina que impactam a resposta à insulina diante do uso da melatonina exógena [23, 24].

2.1.2 A melatonina e o relógio biológico

A regulação dos ritmos biológicos envolvendo a melatonina e os genes responsáveis por esse processo é complexo, mas altamente coordenado. Os genes centrais envolvidos na regulação dos ritmos biológicos são o *Clock*, *Bmal1* (também conhecido como *Arntl*), *Per1*, *Per2*, *Cry1* e *Cry2*. Esses genes desempenham papéis cruciais na manutenção do ritmo circadiano e são expressos em uma variedade de tecidos e células do corpo. O gene *Clock* codifica a proteína *Clock*, enquanto o gene *Bmal1* codifica a proteína *Bmal1*. Essas proteínas formam um complexo de transcrição que ativa a expressão de outros genes ao se ligar a regiões específicas do DNA, chamadas de elementos E-box, presentes nos promotores desses genes-alvo [54].

Quando o complexo *Clock/Bmal1* é ativado, ele induz a transcrição dos genes *Per1* e *Per2*. As proteínas *Per1* e *Per2* são então sintetizadas e se acumulam nas células. Essas proteínas

do relógio interagem entre si e com outras proteínas, incluindo as proteínas Cry1 e Cry2. O complexo Per/Cry é formado quando as proteínas Per1 e Per2 se associam às proteínas Cry1 e Cry2. Esse complexo migra para o núcleo celular e inibe a atividade do complexo Clock/Bmal1, suprimindo assim a transcrição dos genes Clock e Bmal1. É aqui que a melatonina desempenha um papel crucial. Durante a noite, quando a luz ambiental diminui, o núcleo supraquiasmático estimula a produção de melatonina que se liga aos receptores MT1 e MT2. Essa ligação ativa uma cascata intracelular, culminando em alterações na expressão gênica e no funcionamento desses relógios [55].

Um dos principais efeitos da melatonina é a supressão da atividade do complexo Clock/Bmal1. A melatonina atua inibindo a expressão do gene Clock e reduzindo a estabilidade da proteína Clock. Isso impede a formação do complexo Clock/Bmal1 e, conseqüentemente, diminui a transcrição dos genes Per1 e Per2. Além disso, a melatonina promove a estabilização dos complexos Per/Cry, prolongando sua ação inibitória sobre o complexo Clock/Bmal1. Isso permite um feedback negativo robusto, onde a melatonina regula a expressão desses genes e o ritmo circadiano de forma coordenada [31, 55].

2.1.3 Luminosidade e melatonina

A luz do sol é o principal sincronizador do nosso relógio biológico. Antes da existência da luz elétrica, o sol era a principal fonte de luz durante o dia e a sua ausência à noite implicava em uma escuridão efetiva. O surgimento da luz elétrica mudou essa realidade. Durante o dia somos expostos a uma luz artificial que apresenta intensidade diferente daquela proporcionada pela luz do sol. À noite somos expostos a diversas formas de luz artificial como a iluminação das vias públicas e, também, à luz dos aparelhos eletrônicos como celulares, computadores e televisão. Estudos prévios têm demonstrado que a ruptura do ritmo circadiano está associada a transtornos metabólicos como obesidade e DM2. A exposição excessiva à luz, principalmente, durante o período noturno pode ser uma fonte desse problema. Esse fato está associado à supressão da melatonina causada pela luz elétrica [56, 57]. A melatonina, conforme comentamos, é uma substância fundamental na regulação das proteínas relacionadas ao nosso relógio biológico. Estudos transversais têm apontado uma maior incidência de doenças metabólicas como diabetes e obesidade em trabalhadores noturnos. A exposição à luz noturna pode levar ao aumento de doenças metabólicas pela maior incidência de distúrbios do sono

(distúrbios de qualidade ou duração), ou por quebra do ritmo circadiano. Separar essas duas condições na prática clínica é uma tarefa desafiadora [57]. Este trabalho não acessou a exposição dos pacientes à luminosidade. Essa dificuldade está relacionada ao fato do nosso estudo ocorrer no contexto de vida real, não sendo possível aferir essa variável.

2.2 A melatonina exógena

A farmacocinética da melatonina exógena é influenciada por diversas variáveis: dose, formulação (liberação lenta, liberação imediata, liberação lenta com pico sustentado), idade, metabolização hepática, momento de uso. Diante disso, os estudos sobre a meia vida, tempo para o pico, valor no pico, são divergentes[58-60].

Gooneratne, N, S; et al. comparou a meia vida da melatonina de liberação lenta e pico sustentado de 0,4 mg e 4 mg[58]. Neste trabalho, o tempo para alcançar o pico, a meia vida, o *clearance* e a distribuição da melatonina foram semelhantes, em ambas as formulações. Entretanto, os valores da melatonina na dose de 4 mg durante o pico foram maiores do que aqueles encontrados aferindo-se a melatonina endógena. Isso pode ser um fator risco para manutenção de doses supra-fisiológicas da melatonina durante o dia, quando esse hormônio por ação da luz solar deveria reduzir sua concentração[58]. Esses resultados são semelhantes àqueles de estudos com melatonina de liberação rápida[60]. No estudo citado, entretanto, a comparação torna-se mais adequada pelo fato do comportamento farmacodinâmico da melatonina de liberação lenta ser mais semelhante à melatonina endógena.

Teoricamente a melatonina exógena poderia ser incorporada ao arsenal terapêutico de pacientes com insônia. À medida que envelhecemos, esses distúrbios tornam-se mais frequentes, o que pode estar ligado à redução dos níveis séricos, e, também, da ciclicidade fisiológica desse hormônio[61]. Soma-se a isso, o fato de que a melatonina não apresenta efeitos sedativos típico dos benzodiazepínicos[62]. Apesar disso, essa substância não parece funcionar bem como um medicamento hipnótico. Os estudos sobre melatonina e insônia apresentam resultados divergentes[63]. O papel da melatonina exógena parece mais relacionado à sua ação como um cronobiótico[64, 65]. O seu uso, então, tem sido voltado para distúrbios do ritmo circadiano causados pela síndrome do jet lag ou para trabalhadores que alternam turnos de trabalho[66-68]. Estudos prévios demonstram que o uso por 5 dias dessa substância foi capaz de resincronizar o ritmo biológico, causando um avanço de fase em até 2 horas[69]. Esse dado

parece bem prático, principalmente para pessoas expostas a grandes diferenças de fusos horários ao sair de uma localidade para outra.

O melhor entendimento da fisiologia e do papel da melatonina endógena permitirá o desenvolvimento de preparações capazes de imitar essa ação e promover o uso adequado dessa substância na prática clínica.

2.3 Melatonina e o efeito Carry over em estudos crossover

Em estudos crossover, um período de washout adequado deve ser proposto. Neste trabalho, comparamos a ação da melatonina em relação ao placebo nos mesmos indivíduos, com um período de uma semana de washout. Esse tempo seria adequado? Teria resquícios da intervenção inicial após uma semana de washout? Como a melatonina tem meia-vida curta, acreditamos que sua influência não estará presente após uma semana de término do seu uso. Um período de washout de uma semana, portanto, parece suficiente, visto que a meia-vida da melatonina é de 10 a 60 minutos[70, 71].

2.4 A variabilidade glicêmica

O papel da variabilidade glicêmica nas complicações crônicas do DMT2 tem sido amplamente discutido[72]. Apesar da associação de causa e efeito ser controversa em trabalhos mais antigos como o UKPDS, é fato que uma maior variabilidade glicêmica expõe os pacientes a um maior risco de hipoglicemia, uma condição que implica em riscos ao sistema nervoso central, e, também, a um maior risco de eventos cardiovasculares[73]. Apenas por esse motivo, o seu estudo já teria grande importância. Trabalhos mais recentes, porém, tem mostrado que algumas complicações microvasculares[74, 75] parecem mais presentes em pacientes em que a glicemia capilar apresenta ampla variação entre o pré e pós prandial com maior incremento maior[76].

A heterogeneidade de metodologias para o cálculo da variabilidade glicêmica pode explicar diferentes resultados em pesquisas sobre esse tema. Diferentes dispositivos e cálculos matemáticos são usados para essa tarefa. A validade interna desses métodos é frágil, pois não há um padrão ouro[18].

O desvio padrão é um método muito usado para o cálculo da variabilidade glicêmica. Ele pode ser obtido através da análise de 7 pontos da curva glicêmica (glicemia pré e pós prandial do café, almoço e jantar (6 pontos) + a glicemia de jejum do dia seguinte. Um problema dessa análise é que muitas glicemias (picos e nadires), podem não ser identificadas. O uso de um monitoramento contínuo da glicose, poderia resolver parcialmente esse problema, mas o alto custo dessa medida inviabiliza esse dispositivo na prática clínica. Uma crítica ao desvio padrão é o acréscimo a ele da glicemia de jejum do dia seguinte que não acompanha a lógica das demais aferições pré e pós prandiais. Uma análise de apenas de 6 pontos da curva nos parece mais lógica[77]. Outra inconsistência é o fato de que as glicemias capilares em pacientes *com diabetes mellitus*, apresentam um padrão não paramétrico de distribuição, sendo que o desvio padrão é uma medida de dispersão de dados paramétricos. A palavra “aparente” foi intencionalmente usada, pois há uma explicação estatística para o fato. O cálculo do desvio padrão segue um padrão linear com medidas interquartis da glicemia[18]. Os interquartis são usados para dados não normais e, portanto, o uso do desvio padrão fica assim validado por essa coincidência estatística.

Outra medida importante no cálculo da variabilidade glicêmica é o coeficiente de variabilidade glicêmica. Ele pode ser obtido ao dividir-se o desvio padrão pela média glicêmica. Aqui teremos problemas semelhantes ao desvio padrão, entretanto, este dado encontra-se um pouco mais refinado por considerar a média das glicemias encontradas. Esse dado é de fácil obtenção na prática clínica e tem sido preferido por vários autores que estudam esse assunto[36]. Idealmente a variabilidade glicêmica deve ser calculada com após 14 dias de aferições de glicemias pré e pós prandiais nas três principais refeições do dia.

O valor M usa a distância de seis medidas da glicose em relação a um valor considerado normal. Mas qual valor da glicemia pode ser considerado normal? Alguns trabalhos falam em 100 mg/ dl outros em 120mg/ dl. Essa indefinição não permite uma comparação entre diferentes estudos[36].

O valor da média da amplitude das incursões glicêmicas (MAGE), considera glicemias aferidas de hora em hora por 48 horas. Como a variação de 1 desvio padrão é encontrada em pessoas saudáveis, essa metodologia não considera variações inferiores a esse valor. Esse fato tem sido objeto de crítica dessa metodologia. De fato, não sabemos se essa variabilidade inferior

a um desvio padrão em pessoas com diabetes teria implicações clínicas ou seriam inocentes, tal qual ocorre em pessoas sem a doença[77].

Outras duas metodologias utilizadas são o CONGA que usa o desvio padrão de diferenças somadas de duas glicemias e o MODD que usa diferenças de duas glicemias aferidas em dois dias consecutivos no mesmo horário. Enquanto o CONGA apresenta a limitação do uso de monitores de glicose contínua, o MODD apresenta como limitação o fato da variabilidade da glicemia em dias diferentes poder ser influenciada por fatores como dieta e atividade física diferentes nos dias avaliados[77].

2.5 Variabilidade glicêmica e estudos crossover

Os estudos crossover apresentam uma vantagem sobre os estudos de grupos paralelos: comparar duas ou mais intervenções no mesmo indivíduo. Isso reduz possíveis vieses relacionados às diferenças entre os grupos. Esse tipo de estudo é adequado para doenças crônicas e para testar drogas que controlam uma doença, mas não a curam. A cura da doença em um período do estudo tornaria sem sentido o uso de outro medicamento ou mesmo o placebo no período seguinte[70].

Ao estudar um desfecho influenciado por diversas variáveis, este delineamento permite uma comparação mais confiável com um n menor. É o caso da avaliação da variabilidade glicêmica em pacientes com DMT2. A variabilidade glicêmica em pacientes com DMT2 pode ser influenciada por diversos fatores. Medicamentos, duração do diabetes, idade, dieta, atividade física. Na evolução do tratamento do DMT2, houve a preocupação em desenvolver drogas que reduzissem a oscilação da glicemia: inibidores DDPIV, análogos de GLP1 e insulinas ultra-lentas[78]. Pacientes com DMT2 são tratados com uma combinação variada dos medicamentos disponíveis. Por esse motivo, parear grupos para comparação da variabilidade glicêmica seria uma tarefa complexa. Somam-se a isso as diferenças individuais na dieta e na atividade física. Assim, um estudo crossover é mais adequado para o propósito deste trabalho.

3 Materiais e métodos

3.1 Objetivos

3.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar se a suplementação de 3 mg de melatonina a noite alteraria a variabilidade glicêmica de pacientes com *Diabetes Mellitus* Tipo 2 (DMT2).

3.1.2 Objetivos específicos

O primeiro objetivo específico foi o de avaliar se a melatonina pode alterar a variabilidade glicêmica de pacientes com DMT2 em horários isolados do dia: café da manhã, almoço e jantar.

O segundo objetivo específico avaliou se 7 dias de uso de melatonina modificou a variabilidade glicêmica de pacientes com DMT2.

O terceiro objetivo específico desse estudo avaliou se o uso de melatonina alterou o coeficiente de variabilidade glicêmica de pacientes com DMT2.

O quarto objetivo específico desse estudo avaliou se o uso da melatonina alterou a variabilidade glicêmica durante o período noturno.

3.2 Desenho do estudo

Este foi um estudo crossover, duplo-cego, randomizado e placebo controlado. Trinta pacientes participaram deste trabalho. Esses pacientes foram randomizados em 2 grupos: o grupo placebo-washout-melatonina (3 mg), que recebeu placebo por 7 dias, seguidos de 7 dias sem a medicação do estudo (período de washout) e seguidos de 7 dias de melatonina 3mg; ou, alternativamente, o grupo melatonina (3mg)-washout-placebo, que recebeu melatonina 3mg por 7 dias, seguidos de 7 dias sem a medicação do estudo (período de washout) e seguidos de 7 dias de placebo. Quando 15 pacientes foram alocados em uma das possíveis ordens de intervenção (placebo seguido de melatonina ou melatonina seguida de placebo), os outros 15 pacientes foram alocados na ordem de intervenção ainda não concluída. Os pacientes foram orientados a fazer uso de uma cápsula (que poderia conter 3 mg de melatonina ou placebo) às 21 horas. Os pacientes receberam orientações sobre dieta e atividade física seguidas durante essas três semanas. Os pacientes foram orientados a realizar 30 minutos de atividade física, 5 vezes por semana ou 50 minutos, 3 vezes por semana nos mesmos dias. Sobre a dieta os pacientes foram orientados a realizar uma dieta de 30 kcal/ kg, de 1500 a 2500 kcal conforme o peso corporal. Foi orientado ainda, que os pacientes mantivessem uma dieta similar durante as semanas do estudo e principalmente durante os dias de aferição glicêmica. No 5º, 6º e 7º dia da primeira

semana, e no 5º, 6º e 7º da terceira semana, os pacientes utilizaram um glicosímetro para realizar a monitoração da glicemia capilar em jejum, 2 horas após o café da manhã, antes do almoço, 2 horas após o almoço, antes do jantar e 2 horas após o jantar. O primeiro dia de uso da melatonina ou placebo a noite foi considerado o D0.

3.2.1 Cegamento

Os frascos contendo a melatonina e o placebo foram numerados, 1 e 2, não necessariamente nessa ordem. O responsável pela atribuição dos números foi a única pessoa com conhecimento de quais frascos continham a melatonina e quais continham placebo. Esta pessoa não participou de nenhuma outra fase do estudo. Todas as outras pessoas envolvidas neste projeto (pacientes, pesquisadores médicos, estatísticos e assistentes) foram cegas em relação às substâncias contidas em cada frasco. Após a conclusão da análise estatística, os pesquisadores foram informados sobre qual frasco continha a melatonina e qual continha o placebo. As cápsulas de melatonina e placebo foram manipuladas na farmácia artesanal em Belo Horizonte, lote de produção 0630/0122. O insumo de melatonina foi proveniente da china. O placebo foi composto por aerosil + amido+ celulose micronizada + talco. As cápsulas, tanto do placebo (frasco2) quanto da melatonina (frasco 1) apresentavam -se idênticas quanto a cor (brancas), cheiro (inodoras) e formato, sendo impossível distinguir qual cápsula seria a melatonina e qual seria o placebo. Os frascos também eram idênticos exceto pela numeração (Figura 1).

Figura 1

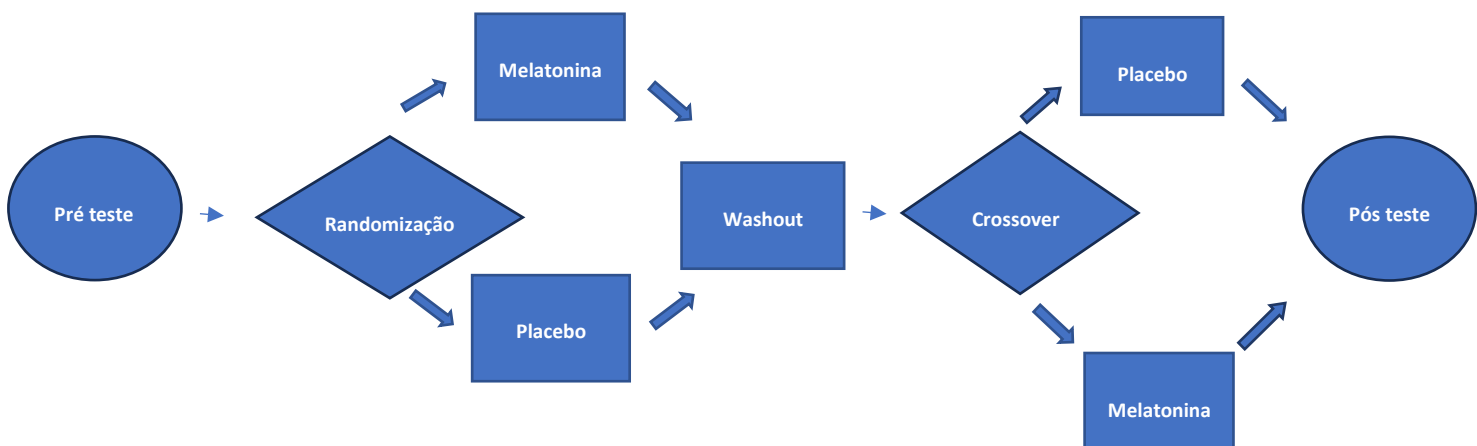


3.2.2 Randomização

Os pacientes foram randomizados em dois grupos. O Grupo 1 fez uso da substância contida no frasco 1 na primeira semana, não fez uso de substâncias na segunda semana (período de washout) e na terceira semana fez uso da substância contida no frasco 2. O Grupo 2 usou a substância contida no frasco 2 na primeira semana, não usou substâncias na segunda semana (período de washout) e, na terceira semana, usou a substância contida no frasco 1.

Os pacientes foram divididos nesses grupos de acordo com o resultado do lançamento de um dado. Quem tirou um número de 1 a 3 foi para o grupo 1 e aqueles que sortearam os números de 4 a 6 foram para o grupo 2. Os pesquisadores do projeto estavam cientes sobre quais pacientes usaram o frasco 1 ou 2 na primeira e terceira semanas, mas não sabiam qual frasco continha o placebo e qual continha melatonina, até a análise dos dados ser concluída.

3.2.3 Fluxograma



3.3 Aspectos éticos

Os participantes envolvidos neste estudo assinaram um termo de consentimento livre, esclarecido e informado que foi elaborado de acordo com a Declaração de Helsinki. O termo em questão foi inicialmente aprovado, juntamente com todo o projeto aqui delineado, pelo comitê de ética da Universidade Federal de Minas Gerais. O convite para participar deste estudo foi realizado em uma consulta de rotina no consultório do médico endocrinologista (WM). Os participantes que atenderam aos critérios de inclusão, participaram voluntariamente. Não houve

pagamento. Todos os objetivos da pesquisa, bem como os riscos potenciais relacionados ao uso da melatonina, foram explicados. Enfatizamos que a melatonina é uma substância de baixo risco com poucos efeitos colaterais. Um possível risco seria a sonolência diurna, mas isso é improvável devido à meia-vida muito curta do medicamento.

3.4 Tamanho da amostra

O tamanho da amostra inicial foi de trinta pacientes. Conforme referenciado na literatura, quando não conhecemos o desvio padrão e as frequências populacionais de determinada variável, deve-se realizar um pré-teste com 30 a 40 pacientes e considerar o comportamento desse grupo como uma estimativa populacional[71]. Após a coleta dos dados da primeira e terceira semanas nós calculamos o desvio padrão das diferenças pré e pós prandiais gerais e em cada refeição entre o grupo placebo e controle. Determinamos então que uma variação acima de 1 DP em relação ao placebo deveria ser detectada para o cálculo do nosso n. Fizemos isso em relação aos diversos objetivos desse estudo e o maior n encontrado foi de 17 pacientes. Uma ampliação do valor do DP a ser detectado teria reduzido ainda mais o tamanho da nossa amostra, por esse cálculo.

3.5 Participantes

3.5.1 Critérios de inclusão e exclusão

3.5.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos neste projeto: (1) pacientes com DMT2 há mais de um ano, (2) idade maior ou igual a 40 anos, (3) história familiar de DMT2 e (4) glicohemoglobina entre 7 e 10%. Foi estabelecido o item (1) DMT2 por mais de um ano, pois o primeiro ano de diagnóstico pode apresentar um paciente que ainda não atingiu seu controle glicêmico basal. Alguns pacientes podem apresentar melhora significativa da glicotoxicidade das células beta no primeiro ano com redução da glicemia e, portanto, variações muito amplas da glicemia de uma semana para a outra devido a essa melhora. No item (2), a idade foi limitada, visto que a maioria dos indivíduos com DMT2 tem mais de 40 anos. Dessa forma, evitamos incluir no estudo indivíduos com diabetes autoimune ou genético. O item (3) é importante porque homogeneiza ainda mais nossos pacientes. Sabemos que o DMT2 tem um forte componente hereditário, ao contrário de

outros tipos de *diabetes mellitus*. No item (4) limitamos uma faixa de valores de glicohemoglobina de 7 a 10%. Nosso objetivo foi homogeneizar a variabilidade glicêmica entre nossos pacientes, pois sabe-se que ela aumenta com o aumento da glicohemoglobina.

3.5.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos deste estudo: (1) mulheres grávidas, (2) pacientes em uso recente de corticoides (menos de 3 meses) ou outros medicamentos hiperglicêmiantes, (3) pacientes que apresentavam condições que alterassem significativamente a estabilidade glicêmica (como em casos de insuficiência renal, síndrome coronariana aguda recente e outras doenças como câncer, insuficiência hepática, entre outras). Também foram excluídos (4) pacientes que se recusaram a participar desta pesquisa em algum momento e (5) aqueles que apresentaram diabetes descontrolado com sintomas de polidipsia, poliúria, perda de peso demandando outras medidas, além de dieta, atividade física e medicamentos já em uso. Foram excluídos deste estudo (6) pacientes com critérios de alto risco para apneia do sono grave, (7) depressão e (8) trabalhadores que alternavam os turnos de trabalho, (9) pacientes que apresentavam epilepsia, quadro que pode se agravar com o uso da melatonina e (10) pacientes que já estavam em uso de melatonina.

A maioria dos critérios de exclusão tiveram a função de limitar condições que gerariam variabilidade glicêmica muito elevada entre as semanas do estudo. É pouco provável que o uso da melatonina seja capaz de reduzir a variabilidade glicêmica imposta aos pacientes em uso de corticóides, por exemplo. Pacientes com alto risco para apneia do sono, depressão ou que alternavam turnos de trabalho foram excluídos devido a estudos que mostraram a influência negativa dessas condições no controle glicêmico. Estudos específicos com essas populações parecem mais adequados para o objetivo aqui proposto.

3.7 Procedimentos e Coleta de dados

Os pacientes com DMT2, conforme mencionado, foram selecionados para participar deste estudo durante uma consulta de rotina realizada em um ambulatório de endocrinologia. Ao final de uma consulta habitual, o endocrinologista, ao verificar que o paciente atendia aos critérios de inclusão, questionou ao paciente se ele teria interesse em participar de uma pesquisa

sobre diabetes e melatonina. Esta pergunta foi seguida pela leitura do termo de consentimento livre e esclarecido. Todas as etapas da pesquisa foram explicadas ao paciente. Para os pacientes que concordaram em participar do projeto, o pesquisador solicitou a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Uma cópia deste formulário foi entregue ao paciente. Em seguida, o pesquisador solicitou ao paciente que lançasse um dado. Os pacientes que sortearam um número de 1 a 3 foram para o grupo 1 e incluídos na seguinte sequência: frasco 1 - washout - frasco 2. Aqueles que sortearam um número de 4 a 6 foram incluídos na sequência frasco 2 - washout – frasco 1. Após alocar o paciente a um dos grupos da intervenção, o pesquisador do projeto preencheu a ficha de pesquisa, que continha os dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes: idade, sexo, duração do diabetes, histórico de epilepsia, uso de insulina (ou não), questionário STOP-BANG peso, altura, índice de massa corporal, circunferência abdominal e valor de HbA1C. Após esta etapa, o paciente foi orientado sobre dieta e atividade física a serem realizados durante as três semanas do projeto. Após essas orientações, os pacientes receberam: glicosímetro, tiras para dosagem de glicemia capilar e lancetas. Além disso, os pacientes receberam uma tabela para registrar os valores de glicemia capilar. Ao final da terceira semana, os pacientes retornaram com os valores de glicemia aferidos.

3.8 Instrumentos

3.8.1 Avaliação da variabilidade glicêmica

Conforme mencionamos não há um padrão ouro para a avaliação da variabilidade glicêmica[18]. A validação dos métodos disponíveis é precária, pois poucos estudos foram realizados em alguns deles. Todos os métodos citados para essa finalidade apresentam, ainda, algum tipo de falha. A principal delas é omitir variações de glicemias que ocorrem entre duas aferições.

Neste trabalho incluímos uma metodologia simples que é o coeficiente de variabilidade glicêmica, que é o desvio padrão dividido pela média glicêmica. Este método é validado pela literatura. Além disso calculamos a variabilidade glicemia que ocorre entre o pré e pós prandial do café, almoço e jantar. A variabilidade glicêmica que ocorre entre medidas próximas tem

grande importância pela velocidade dessa oscilação. De fato, uma glicemia que varia rapidamente entre dois momentos é capaz de desencadear uma série de eventos hormonais contra-regulatórios, para manter a homeostase. Nesse sentido acreditamos que o poder inflamatório da variação entre o pré e pós prandial seja maior do que aquele ocorrido entre duas glicemias pré prandiais (por exemplo: glicemia pré café da manhã e pré almoço). O cálculo foi realizado de duas formas: considerando-se a amplitude da diferença da glicemia pós prandial menos a glicemia pré prandial. Neste caso, o aumento ou redução da glicemia em x mg/ dl, não alterou o resultado, pois esse valor foi sempre considerado positivo (Delta). A outra forma de cálculo considerou a diferença entre pós e pré prandial e valores negativos, portanto, estraram na análise. Do ponto de vista prático, essa última análise parece ter grande importância, pois o incremento positivo da variação da glicemia capilar foi priorizado. De fato, o poder inflamatório da hiperglicemia para complicações microvasculares é mais reconhecido do que o relacionado à hipoglicemia.

3.8.2 Variáveis do estudo

As variáveis clínicas do estudo foram obtidas por meio de uma anamnese sistematizada. Foram incluídas: idade, sexo, índice de massa corporal, uso ou não de insulina, profissão, escolaridade, presença de doenças crônicas, trabalhos com mudanças de turnos ou não, tempo de diagnóstico de DMT2, medicações em uso, uso ou não de insulina, uso ou não de medicações indutoras do sono, história familiar de DMT2, circunferência abdominal, cervical e pressão arterial.

O valor da HbA1C que refere-se à média da glicemia dos últimos três meses foi obtido de todos os pacientes. Limitamos nossa amostra a pacientes com HbA1C entre 7 e 10%. De fato, uma maior variabilidade glicêmica é encontrada em pacientes com um valor mais alto de HbA1C. Por isso não incluímos aqueles com HbA1C < 7%. Entretanto, afim, de termos uma homogeneidade da variabilidade glicêmica em todos os pacientes, limitamos a 10% o valor máximo de HbA1C para entrar no estudo. Posteriormente avaliamos se os pacientes que foram randomizados para intervenção na ordem melatonina- washout- placebo tiveram valores médios de HbA1C diferente daqueles que foram randomizados para a ordem placebo- washout- melatonina.

Obtivemos também o questionário de STOP- BANG[79] para avaliação da apnea obstrutiva do sono. Pacientes com alto risco de apnea do sono (score de STOP-BANG > 4) foram excluídos do estudo.

A variabilidade glicêmica foi obtida da seguinte forma:

Geral:

Média da soma das diferenças das glicemias pós e pré prandiais dos três dias e dos três horários de aferições glicêmicas. Considerando valores negativos (absoluta) na diferença e apenas positivos(relativa).

Específica:

Média da soma das diferenças do café almoço e jantar separadamente, dos três dias de aferições glicêmicas. Considerando valores negativos (absoluta) na diferença e apenas positivos(relativa).

Média da soma da diferença do pós e pré prandiais do café almoço e jantar do D7.

Diferença dos pós e pré café, almoço e jantar do D7, para análise separada desses horários no D7.

Desvio padrão dividido pela média das glicemias dos três dias para o calculo do coeficiente de variabilidade glicêmica.

3.8.3 Questionário de STOP BANG

A apnea obstrutiva do sono apresenta elevada prevalência em pacientes com DMT2. Dado o alto custo para o seu diagnóstico, o *screening* para avaliar quais pacientes devem realizar esse exame é de grande importância [80]. O questionário mais sensível e específico usado para essa finalidade atualmente é o STOP-BANG [81].

O STOP-BANG é um questionário auto-relatado e consiste em 8 perguntas sim/não. Soma-se 1 ponto para cada resposta afirmativa. Quando um ponto de corte ≥ 3 foi usado em uma amostra de pacientes cirúrgicos, o questionário STOP-BANG mostrou as seguintes probabilidades para o diagnóstico de AOS: sensibilidade de 83,6%, especificidade de 56,4%, valor preditivo positivo (VPP) de 81,0% e valor preditivo negativo (VPN) de 60,8% [82] [83].

Em 2016 foi realizada uma adaptação cultural da versão portuguesa desse questionário para o Brasil e em 2017, essa versão foi validada para uso no Brasil. Na validação para o Brasil

o escore STOP-BANG (≥ 3 pontos) mostrou as seguintes probabilidades para a identificação de OSA: sensibilidade de 83,5%, especificidade de 45,5%, VPP de 84,7%, VPN de 43,3% e precisão de 75,2% [84]. Neste trabalho utilizamos o ponto de corte > 4 para caracterizar o paciente como tendo um alto risco de apnea do sono. Esse ponto de corte tornou mais específica a exclusão de pacientes com apnea do sono em nosso trabalho.

3.9 Análise estatística

As variáveis quantitativas com distribuição normal representadas pela curva gaussiana, tiveram sua tendência central expressa como média e sua dispersão quantificada pelo desvio padrão. Para as variáveis com distribuição não normal, a tendência central foi descrita pela mediana e sua dispersão pelos quartis de 25% e 75%. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para avaliar a normalidade. Variáveis categóricas foram apresentadas usando frequência absoluta e porcentagem.

Análises estatísticas para variáveis quantitativas normais, antes e depois da intervenção, foram realizadas por meio do teste t pareado. Quando a distribuição não for normal, empregamos o teste de Wilcoxon.

Os pacientes foram comparados entre si com base nos resultados da glicemia capilar obtidos durante a primeira e terceira semana.

Os dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes foram comparados entre os grupos 1 e 2, a fim de avaliar se o processo de randomização gerou grupos semelhantes do ponto de vista estatístico.

O nível de significância empregado foi de 0,05, sendo o software de escolha o SPSS versão 20.0.

4 Resultados

30 pacientes participaram desse trabalho. 15 deles sofreram a intervenção na ordem placebo – washout- melatonina e outros 15 pacientes melatonina -washout -placebo. A tabela 1 apresenta os dados epidemiológicos e clínicos dos pacientes por ordem de intervenção. Nosso grupo foi formado por pacientes com uma média de idade acima de 60 anos. Tempo de diagnóstico médio de 13 anos e com quadro de obesidade, pois o índice de massa corporal mediano estava > 30 . Os pacientes desse estudo apresentavam bom controle glicêmico

mediano: HbA1C em torno de 7,3%. O quartil 75%, estava em 8,10% de HbA1C mostrando uma homogeneidade no controle glicêmico desses pacientes. Esse dado é importante, pois quanto maior a HbA1C, maior a variabilidade glicêmica dos pacientes. Não houve diferença entre o uso ou não de insulina entre as duas sequências de intervenção. Esse dado tem grande importância, pois pacientes em uso de insulina podem apresentar uma maior variabilidade glicêmica do que outros pacientes. Apenas 9 pacientes da nossa amostra usavam insulina. A escolaridade dos pacientes, também, se apresentou homogênea, sendo que grande parte dos pacientes apresentavam ensino fundamental ou superior, o que é importante para o bom entendimento de uma pesquisa com essa complexidade. Os dados dessa tabela foram escolhidos, para caracterizar o nosso grupo de pacientes e, também, avaliar se a randomização foi adequada. Como o valor p estava acima de 0,05 na comparação de ambas as sequências de intervenção, podemos concluir que a randomização dos pacientes foi adequada.

Tabela 1: Dados epidemiológicos dos grupos placebo-wasout-melatonina e melatonina- washout- placebo

Variáveis	Melatonina → placebo n=15	Placebo → melatonina n=15	Total: n=30	Valor -p
Idade (média +/-DP)	62,27±8,20	61,87±10,95	62,07±9,51	0,911¹
Gênero				
Feminino	9 (56,2%)	7 (43,8%)	16 (100,0)	
Masculino	6 (42,9%)	8 (57,1%)	14 (100,0)	0,464³
Escolaridade				
Ensino fundamental	0 (0,0)	3 (100,0)	3 (100,0)	
Segundo grau	5 (45,5)	6 (54,4)	11 (100,0)	0,143⁴
Superior	10 (62,5)	6 (37,5)	16 (100,0)	
Tempo de diagnóstico de DMT2				
Média+/- DP	13,20±7,66	14,13±7,94	13,67±7,68	0,745¹
Índice de massa corporal	30,06±5,63	31,55±6,10	30,81±5,81	0,494¹
HbA1C	7,30 (7,10 -8,10)	7,30 (7,00 - 8,40)	7,30(7,10- 8,10)	0,723²

Mediana (Q1;Q3)				
Uso de insulina				
Sim	2 (22, %)	7 (77,8%)	9 (100,0)	0,109 ⁴
Não	13 (61,9%)	8 (38,1%)	21 (100,0)	

1 Teste T; 2 Teste de Mann Whitney; 3 Teste Qui-quadrado de Pearson assintótico; 4 Teste de Qui-quadrado de Pearson exato; 5 DP desvio padrão; DP desvio padrão; Q1 quartil 25%; Q3 quartil 75%

A tabela 2 avalia a diferença entre as glicemias pós menos pré pradiais conforme descrito nos objetivos deste trabalho. Neste caso, enfatizamos que alguns valores entre a diferença de glicemias pós menos pré prandiais podem ser negativos. Alguns pacientes podem ter uma glicemia pós prandial inferior à uma glicemia pré prandial. Por isso, o resultado dessa diferença foi negativo. Portanto, nesta tabela, uma diferença pós menos pré prandial de menos 40mg/ dl, por exemplo, foi comparada a uma glicemia de 80mg/dl. Os resultados foram apresentados conforme a normalidade dos dados e por esse motivo, ora falamos em média e ora em mediana.

A comparação entre o grupo placebo e melatonina não mostrou nenhuma diferença na média geral dos três dias de aferições de glicemia capilar ($p=0,805$). Também, não houve diferença entre as médias ou medianas na análise separada das glicemias do café da manhã, almoço e jantar dos três dias de aferições ($p>0,05$). Curiosamente o valor p foi aumentando à medida que as aferições se distanciavam do momento da manhã. Mostrando que o incremento positivo da variabilidade glicêmica avaliada por essa metodologia, torna-se menos significativo entre os grupos placebo e melatonina à medida que nos afastamos do período da manhã.

A comparação entre as glicemias do D7, entretanto, mostrou uma diferença significativa no café da manhã ($p=0,016$). A média de variação glicêmica no grupo melatonina foi maior do que o grupo placebo. Ou seja, o incremento positivo da variabilidade glicêmica no prandial do café da manhã foi maior com o uso da melatonina do que com o uso do placebo. Figura 2 ilustra a variabilidade glicêmica da melatonina em azul e do placebo em verde. Não houve diferença significativa entre os grupos placebo e melatonina no almoço e jantar do terceiro dia. Da mesma

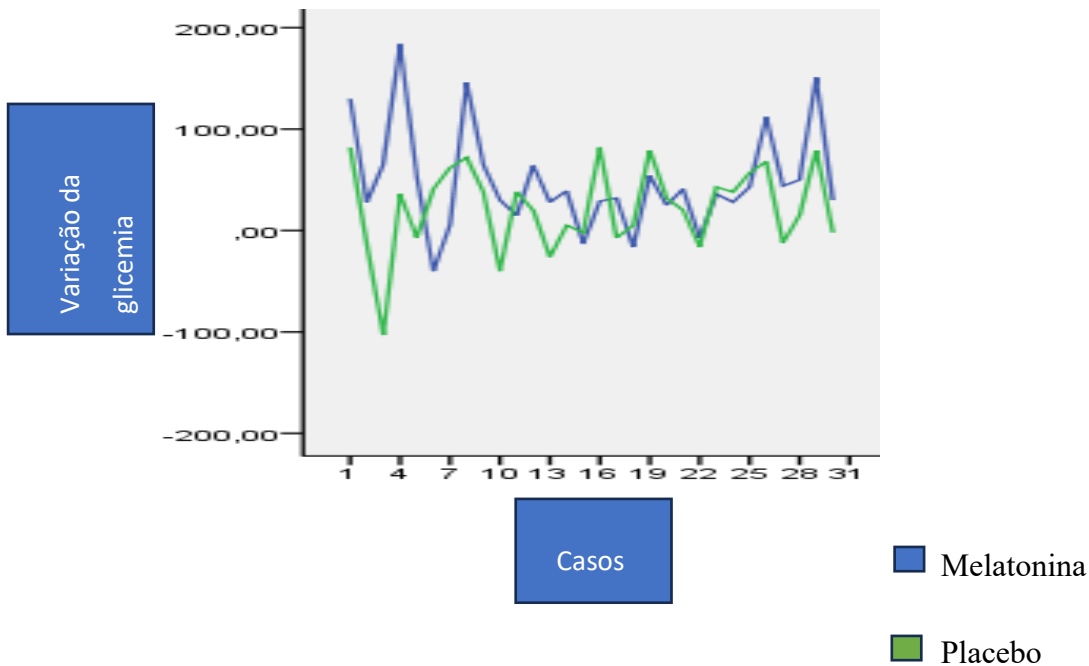
forma que na análise geral das glicemias dos três dias de aferições, notamos que o valor de p aumentou no terceiro dia à medida que a análise se distanciava do café da manhã.

Tabela 2: Diferença real entre glicemias pós e pré prandiais

Variação da glicose analisada (diferença pós – pré prandial)	Placebo	Melatonina	Valor-p
Geral (Mediana(Q1-Q3))	29,16 (11,63-36,66)	25,88 (15,30-45,19)	0,805
Café da manhã (média+/desvio padrão)	31,47 +/-35,30	45,5 +/-39,85	0,058
Almoço (Mediana(Q1-Q3))	25,83 (6,66-52,66)	22,33(7,66-42,83)	0,57
Jantar (média+/desvio padrão)	24,34 +/-32,22	19,41+/-36,45	0,58
Café da manhã do D7 (Mediana(Q1-Q3))	26 (-7 - 58,25)	37,5 (27,25 – 64,25)	0,016
Almoço do D7 (média+/desvio padrão)	25,0 +/- 47,14	33,13 +/- 50,67	0,362
Jantar do D7 (média+/desvio padrão)	15,16 +/-40	15 +/- 39,46	0,98
Geral do D7 (média+/desvio padrão)	20,33(8,0-42,0)	27,5 (9,0-47,5)	0,077

Q1 quartil 25% ; Q3 quartil 75%; D3 terceiro dia de aferição glicêmica

Figura 2:Variação absoluta da glicemia no café da manhã do D7



A tabela 3 apresenta os dados de variabilidade glicêmica conforme o delta entre a diferença da glicemia pós prandial menos pré prandial. Nesta análise consideramos apenas o quanto a glicemia pós prandial se distanciava da pré prandial. Por exemplo: um paciente que teve sua glicemia pré prandial de 100 mg/ dl e pós prandial de 120mg/dl, com uso da melatonina, teve uma variação de 20mg/ dl na glicemia capilar. Se quando esse paciente usou placebo a glicose saiu de 100 mg/ dl no pré prandial para 80 mg/ dl no pós prandial, sua variação foi considerada 20mg/dl e não -20mg/ dl. As análises não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre as diversas aferições feitas com esse delta. Entretanto, chama a atenção, o p de 0,051 do terceiro dia do café da manhã, próximo da significância estatística

Tabela 3: Amplitude da diferença das glicemias pós e pré prandiais

Variação da glicose analisada (Delta)	Placebo	Melatonina	Valor -p
Geral (Mediana(Q1-Q3))	38,22 (29,94-55,75)	37,94(29.27-56,16)	0,829

Café da manhã (Mediana(Q1-Q3))	33,66 (21,25-67,58)	44,5 (28-68)	0,102
Almoço (Mediana(Q1-Q3))	42,33 (24,83-58,91)	36,5 (2,83-49,08)	0,44
Jantar (média+/desvio padrão)	37,60 +/- 22,60	36,21+/- 25	0,86
Café da manhã D7 (Mediana(Q1-Q3))	37 (12,7-63,5)	39,5 (28-64,25)	0,051
Almoço D7 (Mediana(Q1-Q3))	34 (20,75 – 71)	35 (21,75 – 70,5)	0,267
Jantar D7 (Mediana(Q1-Q3))	30,5 (10- 50)	21,5 (9,5- 42,25)	0,558
Geral D7 (Mediana(Q1-Q3))	37 (23,5-50,4)	37,3(26,66-52,16)	0,29

D7 sétimo dia da primeira e terceira semana; Q1 quartil 25%; Q3 quartil 75%

A tabela 4 apresenta os resultados do coeficiente de variação glicêmica comparando a mediana de todos os pacientes que usaram placebo com aqueles que usaram melatonina. Esse coeficiente é dado pelo desvio padrão dividido pela média. Esse dado validado pela literatura para avaliação da variabilidade glicêmica. Nós não encontramos diferenças significativas neste dado na comparação entre o grupo placebo e melatonina, conforme visto pelo $p > 0,05$.

Tabela 4: coeficiente de variabilidade glicêmica (desvio padrão/ média) dos grupos placebo e melatonina

Variabilidade glicêmica	Placebo	Melatonina	Valor- p
-------------------------	---------	------------	----------

Coefficiente de variabilidade glicêmica (Mediana(Q1-Q3))	22,36% (18%-28%)	24,52% (18,7-28%)	0,098
---	-------------------------	--------------------------	--------------

Q1 quartil 25%; Q3 quartil 75%

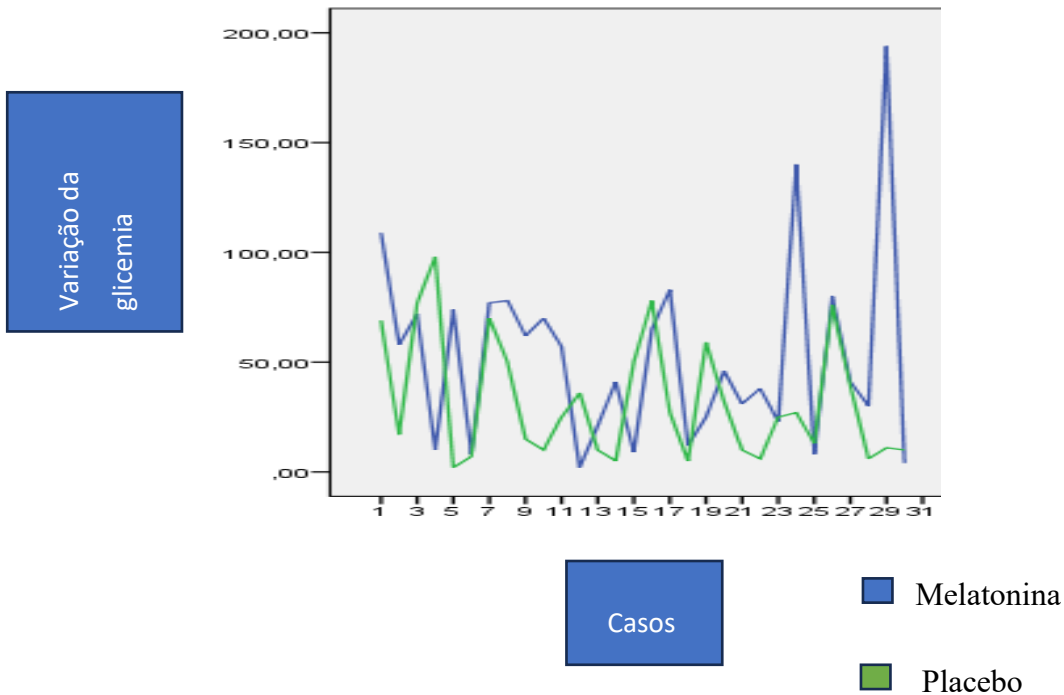
Fizemos também uma análise exploratória do nosso banco de dados, estratificada entre pacientes que usaram insulina e não usaram insulina. Nessa análise foi constatado que nos pacientes que não usavam insulina a variabilidade glicêmica pelo valor do delta (ignorando se positiva ou negativa), do sétimo dia do café da manhã, era significativamente maior no momento de uso de melatonina do que no momento de uso do placebo ($p=0,05$). Ao mesmo tempo no momento do almoço o grupo que usou melatonina apresentava um delta de variabilidade glicêmica menor do que o grupo placebo, mesmo considerando a média dos 3 dias desse horário ($p=0,049$). Outra análise exploratória que realizamos foi referente avaliação da glicemia pós jantar do D6 e pré café da manhã do D7, afim, de avaliarmos se a melatonina alterava a variação da glicemia durante a noite em relação ao placebo. Considerando a variação absoluta da glicemia não tivemos diferença significativa entre o placebo e a melatonina ($p=0,078$). Entretanto, ao considerarmos a amplitude da variação glicêmica obtivemos significativa variação glicêmica. O grupo melatonina variou mais a glicemia do que o grupo placebo ($p=0,032$).

Tabela 5: Variação da glicemia pós jantar do D6 e pré café da manhã do D7

	Placebo	Melatonina	Valor p
Variação da glicemia pós jantar e pré café da manhã (média+/- DP)	32,16 (+/-27,8)	52,26 (+/-42,97)	0,032

DP: desvio padrão

Figura 3: Variação da amplitude da glicemia entre o pós jantar do D6 e o pré café do D7



5 Discussão

Nosso estudo foi o primeiro crossover, duplo cego, placebo controlado e randomizado a avaliar o papel da melatonina na variabilidade glicêmica de pacientes com DMT2. Neste trabalho conseguimos demonstrar que a melatonina 3mg, tomada às 21:00, em relação ao placebo, aumentou a variabilidade glicêmica. A variação significativa da glicemia apontada neste trabalho ocorreu entre o pré e pós prandial do café da manhã do D7 e entre o café da manhã do D6 e o pré café da manhã do D7. Não houve diferença no coeficiente de variabilidade glicêmica. Esses resultados são diferentes daqueles imaginados no início do trabalho. A melatonina é considerada um hormônio que regula o ritmo circadiano, e, portanto, esperávamos, que o seu uso pudesse reduzir a variabilidade glicêmica de pacientes com DMT2, e, não, aumentar. Como explicar, portanto, os resultados aqui encontrados?

Algumas teorias podem explicar o incremento positivo na variabilidade glicêmica no horário do café da manhã do sétimo dia. Os efeitos da melatonina exógena esperados neste trabalho são aqueles relacionados à ausência desse hormônio durante o dia, pois as glicemias capilares foram aferidas no período diurno e a melatonina tomada a noite. Os assim

denominados efeitos prospectivos da melatonina ocorrem quando suas concentrações estão baixas ou indetectáveis. Um tipo de efeito prospectivo da melatonina é o proximal, que ocorre logo após essa substância reduzir sua concentração pela manhã. A partir disso, termina o efeito inibitório noturno da melatonina nos receptores acoplados à proteína G. Esse desligamento do receptor gera um efeito rebote de hipersensibilidade na via intracelular da adenil ciclase/cAMP/PKA/CREB[38]. Estando mais ativa que o normal, essa via poderia elevar de forma brusca a concentração de hormônios contra-reguladores da insulina: hormônio do crescimento, catecolaminas e o cortisol, por exemplo. Em um paciente que tem deficiência de melatonina como aqueles com DMT2 é provável que haja um up regulation dos receptores acoplados à proteína G. O aumento súbito da melatonina por via exógena, poderia causar uma inibição ainda maior dessa via durante a noite e, portanto, um efeito rebote de hipersecreção de hormônios contra- insulínicos ainda maior que o fisiológico pela manhã. Nesse sentido teríamos, portanto, uma elevação da resistência à insulina e conseqüentemente maior variação da glicemia pós prandial, tal qual ocorreu no D7 do nosso estudo pela manhã, quando os pacientes estavam em uso de melatonina. Apesar de haver aumento da secreção de insulina através desse mesmo mecanismo, o que poderia levar à menor elevação da glicemia pós prandial, acreditamos que o citado efeito rebote sobre diversos hormônios que antagonizam a ação da insulina seria preponderante.

Uma outra explicação, para os nossos resultados, pode ter relação com a meia vida da melatonina exógena. Doses maiores de melatonina usadas durante a noite podem levar a um efeito residual desse hormônio além do período noturno[58]. A melatonina pode piorar o controle glicêmico quando sua concentração está elevada durante o dia em momentos que fazemos uma refeição[23] Isso pode explicar a maior variação positiva da glicemia no café da manhã no D7 do estudo. Neste trabalho usamos a dose de 3 mg de melatonina. Essa dose é a mais frequentemente usada nas preparações comerciais desse produto. Entretanto, doses mais baixa, 0,1 a 0,5 mg têm sido preconizadas quando o objetivo for usar a medicação como um cronobiótico[85]. Doses maiores, têm sido usadas para distúrbio do sono, como insônia, mas sem um papel ainda bem definido e com eventuais efeitos residuais[86].

O segundo resultado deste trabalho demonstrou um aumento na amplitude entre a glicemia pós-jantar do D6 e o pré-café da manhã do D7. Isso pode ser explicado pelos efeitos

distais prospectivos da melatonina. A melatonina age diretamente para suprimir a atividade do complexo Clock/Bmal1. Um efeito inibitório prolongado sobre este complexo devido a um efeito não fisiológico da melatonina exógena poderia levar a uma sincronização anormal do relógio biológico, tornando a variação da glicemia durante a noite errática.

Outro importante fator que pode influenciar os resultados da variabilidade glicêmica em estudos sobre melatonina e DMT2 é o polimorfismo do receptor de melatonina MTNR1B rs10830963. Alguns trabalhos demonstram que a mutação desse receptor pode predispor a uma pior resposta glicêmica com o uso da melatonina[24]. O nosso trabalho foi realizado em pacientes com DMT2 e história familiar dessa doença. Ou seja, pacientes com risco aumentado de ter a mutação citada, que predispõe a uma resposta glicêmica pior com o uso de melatonina. Um trabalho recente mostrou que a presença dessa mutação determina uma redução da secreção de insulina na presença de melatonina. Esse estudo foi realizado em pacientes que têm o hábito de jantar tarde da noite [23].

Neste estudo fizemos dois tipos de comparações entre as glicemias pré e pós prandiais. A primeira delas avaliou a diferença real dessas glicemias. Por exemplo, uma variação de pós prandial menos pré prandial cujo resultado foi - 40 foi comparada a outra cujo resultado foi positivo ou mesmo negativo. De fato, esse tipo de análise apresenta uma vantagem, pois, os efeitos inflamatórios de uma variação de glicose negativa[87], são menores do que os efeitos inflamatórios da variação positiva da glicose, ou seja, elevação da glicemia. Por esse motivo, alguns autores têm valorizado a adição dos valores negativos aos cálculos da variabilidade glicêmica[76]. A outra comparação foi realizada apenas entre o delta do pré e pós prandial, sem considerar valores negativos. A variação do delta da glicemia pós menos pré café da manhã do D7 do estudo teve um $p = 0,051$, uma tendência muito forte à significância. Nessa análise a variabilidade glicêmica tendeu a ser maior no grupo que usou melatonina. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que na maior parte das vezes a glicemia pós prandial foi superior a glicemia pré prandial e, portanto, boa parte dos dados analisado foram semelhantes àqueles avaliados considerando-se os valores negativos na diferença, e que foram significantes no D7. Entretanto, um dado que pode ter interferido neste resultado foi a inclusão no estudo de pacientes em uso de insulina. Uma análise estratificada demonstrou que a variação da glicemia pelo delta, foi significativa ($p < 0,05$) nos pacientes que não estavam em uso de insulina. É

possível que o poder da insulina em reduzir a glicemia, tenha sido um viés para o efeito hiperglicemiante da melatonina no período da manhã. Na mesma análise estratificada notamos que o uso da melatonina, em pacientes que não usavam insulina, reduziu as incursões pós prandiais de forma significativa ($p < 0,05$) mesmo considerando a média da variação glicêmica dos três dias de aferições. Acreditamos que no horário do almoço o efeito prospectivo proximal da melatonina que regula a resistência à insulina no jejum e repouso noturno, não esteja presente, permitindo um efeito positivo da melatonina na variabilidade glicêmica aferida pelo delta. Além disso, a chance de haver uma concentração sérica da melatonina aumentada nesse horário é menor, e não teríamos a influência negativa da mutação do receptor MTNR1B descrita. Neste sentido, acreditamos que o efeito prospectivo distal, associado a regulação circadiana da variabilidade glicêmica, do uso da melatonina possa ter ocorrido nesse momento. Este efeito está relacionado à regulação direta dos genes clock. Essas conclusões, entretanto, são meramente exploratórias, pois o desenho prévio do estudo não excluiu pacientes que usavam insulina.

Neste trabalho não podemos definir se maior variação positiva da glicemia no café da manhã após 7 dias de uso de melatonina 3 mg foi um evento positivo ou negativo. Como a variabilidade glicêmica dos nossos pacientes foi pequena uma elevação significativa do ponto de vista estatístico da glicemia pós prandial pela manhã pode não representar um resultado clínico inadequado. De fato, o fisiológico é que a glicemia pós prandial tenha uma elevação mínima de pelo menos um desvio padrão. Uma elevação inferior pode representar um problema para pacientes com DM2 expondo-os ao riscos das hipoglicemias, dado o uso frequente de medicações com maior poder hipoglicemiante. Nesse sentido, podemos, hipotetizar que a suplementação de melatonina pode ter reestabelecido um padrão mais fisiológico de elevação da glicemia nesses pacientes, com eventual benefício do ponto de vista de proteção contra hipoglicemias.

Nosso trabalho apresenta alguns pontos críticos. A avaliação da variação da glicose neste estudo ocorreu apenas entre o pré e o pós prandial. A variação entre duas glicemias pré prandiais não foi avaliada. O coeficiente de variabilidade glicêmica tanto do momento em que os pacientes usaram placebo quanto do momento em que usaram melatonina foi semelhante e pequeno, inferior a 36% na maior parte dos casos e foi construído a partir de glicemias de 3

dias de aferições e não 14 dias como o preconizado. A baixa variabilidade glicêmica pode estar relacionada ao fato de que os pacientes apresentavam uma média glicêmica praticamente na meta, conforme verificado pela média geral da HbA1C que foi em torno de 7,3%. A baixa variabilidade glicêmica do nosso trabalho pode ter ocultado um possível efeito benéfico da melatonina sobre a variação da glicose. Outra crítica ao nosso estudo é o fato de que o tempo de uso da melatonina foi de apenas 7 dias. Um uso mais prolongado pode resultar em desfechos diferentes em relação à variabilidade glicêmica. Outra limitação do trabalho foi o fato de que nós não dosamos previamente a melatonina dos pacientes. A suposição de terem eles uma deficiência de melatonina, vem de trabalhos prévios, que mostraram esse achado em pacientes com DMT2.

Os pontos positivos desse estudo também são relevantes. O fato de ser um estudo duplo cego, placebo controlado, randomizado, dá aos resultados desse estudo uma maior validade metodológica. Nossas análises estratificadas, apesar de não terem sido previamente programadas, abrem propostas para futuros estudos sobre esse assunto com o mesmo modelo em pacientes que não estejam usando insulina. Outro ponto positivo desse estudo é o fato de tratar-se de um estudo de vida real, que pode ter uma aplicação e credibilidade prática superior a estudos realizados em laboratórios ou clínicas onde as variáveis sofrem excessivo controle. A aferição da glicemia capilar dos nossos pacientes por exemplo foi realizada em glicosímetros com fitas reagentes. Apesar dos monitores de glicose continua serem cada vez mais valorizados para essa análise, esses aparelhos, dado o alto custo, não estão presentes no dia a dia dos pacientes. Soma-se a isso o fato de que os pacientes foram triados em um ambulatório de endocrinologia privado sem o fluxo de seleção que ocorre até que os pacientes cheguem a um grande centro terciário. Por fim, os resultados encontrados neste estudo podem ser explicados pelo conhecimento teórico atual sobre a fisiologia da melatonina.

6 Conclusão

Este estudo concluiu que a suplementação de 3 mg de melatonina à noite aumenta a variabilidade do pré e pós-prandial do café da manhã e da glicemia pós-jantar em relação à glicemia de jejum. Fatores relacionados à fisiologia e farmacodinâmica da melatonina, como efeitos diurnos residuais, efeitos prospectivos proximais, prejuízo do efeito prospectivo distal da melatonina causado pela melatonina exógena e características genéticas dos pacientes,

podem explicar os resultados deste trabalho. É possível que a melatonina exógena, em doses menores, com menor risco de efeitos residuais pela manhã, tenha uma ação diferente sobre a variabilidade glicêmica. Estudos futuros, com doses menores desse hormônio e por um maior período de tempo são necessários para avaliar melhor o papel desse hormônio na variabilidade glicêmica de pacientes com DM2.

Referências

1. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, et al. 3. Prevention or Delay of Type 2 Diabetes and Associated Comorbidities: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care*. 2023;46(Suppl 1):S41-S48.
2. Clarke SF, Foster JR. A history of blood glucose meters and their role in self-monitoring of diabetes mellitus. *Br J Biomed Sci*. 2012;69(2):83-93.
3. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, et al. 6. Glycemic Targets: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care*. 2023;46(Suppl 1):S97-S110.
4. Gray A, Raikou M, McGuire A, et al. Cost effectiveness of an intensive blood glucose control policy in patients with type 2 diabetes: economic analysis alongside randomised controlled trial (UKPDS 41). United Kingdom Prospective Diabetes Study Group. *BMJ*. 2000;320(7246):1373-1378.
5. Levin SR, Coburn JW, Abaira C, et al. Effect of intensive glycemic control on microalbuminuria in type 2 diabetes. Veterans Affairs Cooperative Study on Glycemic Control and Complications in Type 2 Diabetes Feasibility Trial Investigators. *Diabetes Care*. 2000;23(10):1478-1485.
6. Committee AM. Study rationale and design of ADVANCE: action in diabetes and vascular disease--preterax and diamicon MR controlled evaluation. *Diabetologia*. 2001;44(9):1118-1120.
7. O'Connor PJ, Ismail-Beigi F. Near-Normalization of Glucose and Microvascular Diabetes Complications: Data from ACCORD and ADVANCE. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2011;2(1):17-26.
8. Lorenzo-Medina M, de la Iglesia S, Ruiz-Garcia L, Quintana-Hidalgo L, Martin-Alfaro R, Herrada J. Pitfalls of glycated hemoglobin in the glycemic assessment of diabetes patients with hemoglobin louisville: role of serum fructosamine. *J Diabetes Sci Technol*. 2013;7(3):804-805.
9. Chatziralli IP. The Role of Glycemic Control and Variability in Diabetic Retinopathy. *Diabetes Ther*. 2018;9(1):431-434.
10. Firouzabadi MD, Poopak A, Sheikhy A, et al. Glycemic profile variability: An independent risk factor for diabetic neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Prim Care Diabetes*. 2023;17(1):38-42.
11. Luo M, Kong X, Wang H, et al. Effect of Dapagliflozin on Glycemic Variability in Patients with Type 2 Diabetes under Insulin Glargine Combined with Other Oral Hypoglycemic Drugs. *J Diabetes Res*. 2020;2020:6666403.
12. Chai S, Zhang R, Zhang Y, et al. Influence of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on glycemic variability in patients with type 2 diabetes: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:935039.

13. Elhabashy SA, Sakr EM, Salah NY. The efficacy of insulin degludec and insulin glargine over NPH insulin among toddlers and preschoolers with type 1 diabetes using glycemic variability and time in range. *Eur J Pediatr*. 2023.
14. Zhu X, Zhao L, Chen J, et al. The Effect of Physical Activity on Glycemic Variability in Patients With Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:767152.
15. Bennetsen SL, Feineis CS, Legaard GE, Lyngbaek MPP, Karstoft K, Ried-Larsen M. The Impact of Physical Activity on Glycemic Variability Assessed by Continuous Glucose Monitoring in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:486.
16. DeVries JH. Glucose variability: where it is important and how to measure it. *Diabetes*. 2013;62(5):1405-1408.
17. Low melatonin secretion is a risk factor for type 2 diabetes. *BMJ*. 2013;346:f2202.
18. Reutrakul S, Sumritsopak R, Saetung S, Chanprasertyothin S, Chailurkit LO, Anothaisintawee T. Lower nocturnal urinary 6-sulfatoxymelatonin is associated with more severe insulin resistance in patients with prediabetes. *Neurobiol Sleep Circadian Rhythms*. 2018;4:10-16.
19. Zhu H, Zhao ZJ, Liu HY, et al. The melatonin receptor 1B gene links circadian rhythms and type 2 diabetes mellitus: an evolutionary story. *Ann Med*. 2023;55(1):1262-1286.
20. Zhang X, Xie L, Zhong M, et al. The association between melatonin receptor 1B gene polymorphisms and type 2 diabetes mellitus (T2DM) in Chinese populations: a meta-analysis. *Ann Palliat Med*. 2020;9(3):957-966.
21. Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep*. 2009;61(3):383-410.
22. Doosti-Irani A, Ostadmohammadi V, Mirhosseini N, et al. The Effects of Melatonin Supplementation on Glycemic Control: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Horm Metab Res*. 2018;50(11):783-790.
23. Garfinkel D, Zorin M, Wainstein J, Matas Z, Laudon M, Zisapel N. Efficacy and safety of prolonged-release melatonin in insomnia patients with diabetes: a randomized, double-blind, crossover study. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2011;4:307-313.
24. Ramirez AVG, Filho DR, de Sa L. Melatonin and its Relationships with Diabetes and Obesity: A Literature Review. *Curr Diabetes Rev*. 2021;17(7):e072620184137.
25. Garaulet M, Gomez-Abellan P, Rubio-Sastre P, Madrid JA, Saxena R, Scheer FA. Common type 2 diabetes risk variant in MTNR1B worsens the deleterious effect of melatonin on glucose tolerance in humans. *Metabolism*. 2015;64(12):1650-1657.
26. Patel R, Parmar N, Pramanik Palit S, Rathwa N, Ramachandran AV, Begum R. Diabetes mellitus and melatonin: Where are we? *Biochimie*. 2022;202:2-14.
27. American Diabetes A. Standards of Medical Care in Diabetes-2017 Abridged for Primary Care Providers. *Clin Diabetes*. 2017;35(1):5-26.
28. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15019.
29. Xia AY, Zhu H, Zhao ZJ, et al. Molecular Mechanisms of the Melatonin Receptor Pathway Linking Circadian Rhythm to Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrients*. 2023;15(6).
30. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*. 2006;273(13):2813-2838.
31. Zhou Z, Sun B, Huang S, Zhu C, Bian M. Glycemic variability: adverse clinical outcomes and how to improve it? *Cardiovasc Diabetol*. 2020;19(1):102.
32. Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res*. 2010;181:127-151.

33. Cipolla-Neto J, Amaral FGD. Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. *Endocr Rev.* 2018;39(6):990-1028.
34. Vasey C, McBride J, Penta K. Circadian Rhythm Dysregulation and Restoration: The Role of Melatonin. *Nutrients.* 2021;13(10).
35. Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie.* 2015;61(2-3):77-84.
36. Quay WB, Payer AF, Parkening TA, Banerji TK, Collins TJ. Melatonin's inhibition of pituitary, adrenal, testicular and accessory gland growth in male golden hamsters: pineal dependence and organ differences with shielding and intracranial surgery. *J Neural Transm.* 1982;53(1):59-73.
37. Li H, Wei J, Ma F, et al. Melatonin Modulates Lactation by Regulating Prolactin Secretion Via Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons in the Hypothalamus- Pituitary System. *Curr Protein Pept Sci.* 2020;21(8):744-750.
38. Tsukamoto-Yamauchi N, Terasaka T, Iwasaki Y, Otsuka F. Interaction of pituitary hormones and expression of clock genes modulated by bone morphogenetic protein-4 and melatonin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;459(1):172-177.
39. Albreiki MS, Middleton B, Hampton SM. The effect of melatonin on glucose tolerance, insulin sensitivity and lipid profiles after a late evening meal in healthy young males. *J Pineal Res.* 2021;71(4):e12770.
40. Lauritzen ES, Kampmann U, Smedegaard SB, Stoy J. Effects of daily administration of melatonin before bedtime on fasting insulin, glucose and insulin sensitivity in healthy adults and patients with metabolic diseases. A systematic review and meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2021;95(5):691-701.
41. Owino S, Sanchez-Bretano A, Tchio C, et al. Nocturnal activation of melatonin receptor type 1 signaling modulates diurnal insulin sensitivity via regulation of PI3K activity. *J Pineal Res.* 2018;64(3).
42. Yoo YM. Melatonin-mediated insulin synthesis during endoplasmic reticulum stress involves HuD expression in rat insulinoma INS-1E cells. *J Pineal Res.* 2013;55(2):207-220.
43. Karamitri A, Plouffe B, Bonnefond A, et al. Type 2 diabetes-associated variants of the MT(2) melatonin receptor affect distinct modes of signaling. *Sci Signal.* 2018;11(545).
44. Marzougui H, Turki M, Ben Dhia I, et al. Melatonin intake before intradialytic exercise reverses oxidative stress and improves antioxidant status in hemodialysis patients. *Int J Artif Organs.* 2023;46(5):264-273.
45. Navarro-Alarcon M, Ruiz-Ojeda FJ, Blanca-Herrera RM, et al. Melatonin and metabolic regulation: a review. *Food Funct.* 2014;5(11):2806-2832.
46. Rodriguez-Santana C, Florido J, Martinez-Ruiz L, Lopez-Rodriguez A, Acuna-Castroviejo D, Escames G. Role of Melatonin in Cancer: Effect on Clock Genes. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3).
47. Gooneratne NS, Edwards AY, Zhou C, Cuellar N, Grandner MA, Barrett JS. Melatonin pharmacokinetics following two different oral surge-sustained release doses in older adults. *J Pineal Res.* 2012;52(4):437-445.
48. Mun JG, Wang D, Doerflein Fulk DL, et al. A Randomized, Double-Blind, Crossover Study to Investigate the Pharmacokinetics of Extended-Release Melatonin Compared to Immediate-Release Melatonin in Healthy Adults. *J Diet Suppl.* 2023:1-13.
49. Harpoe NG, Andersen LP, Gogenur I, Rosenberg J. Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review. *Eur J Clin Pharmacol.* 2015;71(8):901-909.
50. Morera-Fumero AL, Fernandez-Lopez L, Abreu-Gonzalez P. Melatonin and melatonin agonists as treatments for benzodiazepines and hypnotics withdrawal in patients with primary insomnia. A systematic review. *Drug Alcohol Depend.* 2020;212:107994.

51. Salahub C, Wu PE, Burry LD, et al. Melatonin for Insomnia in Medical Inpatients: A Narrative Review. *J Clin Med*. 2022;12(1).
52. Choi K, Lee YJ, Park S, Je NK, Suh HS. Efficacy of melatonin for chronic insomnia: Systematic reviews and meta-analyses. *Sleep Med Rev*. 2022;66:101692.
53. Kunz D, Stotz S, Bes F. Treatment of isolated REM sleep behavior disorder using melatonin as a chronobiotic. *J Pineal Res*. 2021;71(2):e12759.
54. Cruz-Sanabria F, Carmassi C, Bruno S, et al. Melatonin as a Chronobiotic with Sleep-promoting Properties. *Curr Neuropharmacol*. 2022.
55. Tortorolo F, Farren F, Rada G. Is melatonin useful for jet lag? *Medwave*. 2015;15 Suppl 3:e6343.
56. Srinivasan V, Singh J, Pandi-Perumal SR, Brown GM, Spence DW, Cardinali DP. Jet lag, circadian rhythm sleep disturbances, and depression: the role of melatonin and its analogs. *Adv Ther*. 2010;27(11):796-813.
57. Carriedo-Diez B, Tosoratto-Venturi JL, Canton-Manzano C, Wanden-Berghe C, Sanz-Valero J. The Effects of the Exogenous Melatonin on Shift Work Sleep Disorder in Health Personnel: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(16).
58. Caspi O. Melatonin for the prevention and treatment of jet lag. *Altern Ther Health Med*. 2004;10(2):74-78.
59. Dwan K, Li T, Altman DG, Elbourne D. CONSORT 2010 statement: extension to randomised crossover trials. *BMJ*. 2019;366:l4378.
60. Miot HA. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. *J Vasc Bras*. 2011;10:275-278.
61. Kusunoki Y, Konishi K, Tsunoda T, Koyama H. Significance of Glycemic Variability in Diabetes Mellitus. *Intern Med*. 2022;61(3):281-290.
62. Zhang L, Li F, Liu HH, et al. Glycaemic variability and risk of adverse cardiovascular events in acute coronary syndrome. *Diab Vasc Dis Res*. 2022;19(6):14791641221137736.
63. Dhatariya K, Humberstone A, Hasnat A, Wright R, Lujan M, Nunney I. The Association Between Mean Glycated Haemoglobin or Glycaemic Variability and the Development of Retinopathy in People with Diabetes: A Retrospective Observational Cohort Study. *Diabetes Ther*. 2021;12(10):2755-2766.
64. Jin SM, Kim TH, Oh S, et al. Association between the extent of urinary albumin excretion and glycaemic variability indices measured by continuous glucose monitoring. *Diabet Med*. 2015;32(2):274-279.
65. Monnier L, Mas E, Ginet C, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA*. 2006;295(14):1681-1687.
66. Ceriello A, Monnier L, Owens D. Glycaemic variability in diabetes: clinical and therapeutic implications. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7(3):221-230.
67. Clodi M, Abrahamian H, Brath H, et al. [Antihyperglycemic treatment guidelines for diabetes mellitus type 2 (Update 2023)]. *Wien Klin Wochenschr*. 2023;135(Suppl 1):32-44.
68. Godoy PH, Nucera A, Colcher AP, de-Andrade JE, Alves D. Screening for obstructive sleep apnea in elderly: performance of the Berlin and STOP-Bang questionnaires and the Epworth Sleepiness Scale using polysomnography as gold standard. *Sleep Sci*. 2022;15(Spec 1):203-208.
69. Abrishami A, Khajehdehi A, Chung F. A systematic review of screening questionnaires for obstructive sleep apnea. *Can J Anaesth*. 2010;57(5):423-438.
70. Pataka A, Daskalopoulou E, Kalamaras G, Fekete Passa K, Argyropoulou P. Evaluation of five different questionnaires for assessing sleep apnea syndrome in a sleep clinic. *Sleep Med*. 2014;15(7):776-781.

71. Chung F, Yegneswaran B, Liao P, et al. STOP questionnaire: a tool to screen patients for obstructive sleep apnea. *Anesthesiology*. 2008;108(5):812-821.
72. Boynton G, Vahabzadeh A, Hammoud S, Ruzicka DL, Chervin RD. Validation of the STOP-BANG Questionnaire among Patients Referred for Suspected Obstructive Sleep Apnea. *J Sleep Disord Treat Care*. 2013;2(4).
73. Duarte RLM, Fonseca LBM, Magalhaes-da-Silveira FJ, Silveira EAD, Rabahi MF. Validation of the STOP-Bang questionnaire as a means of screening for obstructive sleep apnea in adults in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2017;43(6):456-463.
74. Garaulet M, Lopez-Minguez J, Dashti HS, et al. Interplay of Dinner Timing and MTNR1B Type 2 Diabetes Risk Variant on Glucose Tolerance and Insulin Secretion: A Randomized Crossover Trial. *Diabetes Care*. 2022;45(3):512-519.
75. Hack LM, Lockley SW, Arendt J, Skene DJ. The effects of low-dose 0.5-mg melatonin on the free-running circadian rhythms of blind subjects. *J Biol Rhythms*. 2003;18(5):420-429.
76. Bueno APR, Savi FM, Alves IA, Bandeira VAC. Regulatory aspects and evidences of melatonin use for sleep disorders and insomnia: an integrative review. *Arq Neuropsiquiatr*. 2021;79(8):732-742.
77. Kahal H, Halama A, Aburima A, et al. Effect of induced hypoglycemia on inflammation and oxidative stress in type 2 diabetes and control subjects. *Sci Rep*. 2020;10(1):4750.

Anexos

ANEXO A: Questionário STOP BANG

(Farney et al., 2011& Coelho et al., 2012)

Você ronca alto? (Mais alto do que falando ou que possa ser ouvido através de portas fechadas?)

Durante o dia sente-se frequentemente cansado ou sonolento? Sim /Não

Alguém já reparou que você para de respirar durante o sono? Sim/Não

Você tem ou está sendo tratado para pressão alta? Sim/Não

O seu IMC é maior do que 35 Kg/m²? Sim/Não

Você tem mais do que 50 anos de idade? Sim /Não

Sua circunferência cervical é maior do que 40 cm? Sim/Não

Sexo masculino? Sim/Não

ANEXO B - Parecer consubstanciado do cep

Pesquisador: Título da Pesquisa: Instituição Proponente: Versão: CAAE: Variabilidade da duração do sono: um alvo terapêutico da melatonina para o controle glicêmico de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 Almir Ribeiro Tavares Júnior UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS 2 31990720.7.0000.5149 Área Temática: DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Número do Parecer: 4.259.257 DADOS DO PARECER O estudo proposto avaliará se o uso de melatonina 3 mg a noite pode melhorar a regularidade da duração do sono de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e conseqüentemente reduzir a variação da glicemia ao longo do dia. A variabilidade da glicemia é um fator de risco para complicações crônicas nesses pacientes. De acordo com os autores, estudos recentes tem apontado que pacientes que dormem um número de horas diferentes a cada dia têm pior controle glicêmico. Neste estudo os pacientes irão a aferir a glicemia capilar 6 vezes ao dia em 3 dias da semana usando o placebo e depois outros 3 dias usando a melatonina a noite. Desta forma, será avaliado se a duração do sono ao longo da semana com a melatonina foi mais regular e se a glicemias antes e após as refeições variaram menos. Este será um estudo experimental, clinical trial duplo-cego placebo controlado. Após o projeto ser aprovado pelo comite de ética e pesquisa da UFMG (COEP) os pacientes que se apresentarem à consulta de rotina para o controle do seu diabetes mellitus serão convidados a participarem da pesquisa caso preencham os critérios de inclusão. Após leitura, explicação detalhada desse projeto e assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido, os pacientes que aceitarem participar dessa pesquisa farão por duas semanas aferições diárias da duração do sono através de um acatigrafo (instrumento semelhante a um relógio de pulso que afere e registra a duração do sono) e pelo preenchimento de diários do sono. Na primeira semana do estudo metade desses pacientes receberá placebo e a outra metade fará uso de melatonina via oral 3mg duas horas antes de dormir. Na semana seguinte os pacientes que Apresentação do Projeto: Patrocinador Principal: Financiamento Próprio 31.270-901 (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br Endereço: Bairro: CEP: Telefone: Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad Sl 2005 Unidade Administrativa II UF: MG Município: BELO HORIZONTE Página 01 de 04 UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Continuação do Parecer: 4.259.257 usaram placebo farão uso da melatonina e aqueles que usaram melatonina usarão placebo. Essa ordem será definida de forma randomizada e os pacientes e o pesquisador serão cegos quanto ao uso de placebo ou melatonina. Além dos diários do sono e actigrafia, os pacientes farão glicemias capilares em jejum, 2 horas após o café da manhã, antes do almoço, 2 horas após o almoço, antes do jantar e duas horas após o jantar. Todos os pacientes receberão no início da primeira semana e no início da segunda semana do estudo, a mesma orientação sobre dieta e atividade física. Os pacientes farão ainda dosagens de cortisol basal e às 17 horas após a primeira e após a segunda semana do estudo. E por fim, serão coletadas amostras de esfregaços da região da mucosa da bochecha para análise de genes relacionados ao relógio biológico. A coleta de dados e as intervenções serão realizadas em uma consulta de rotina desses pacientes. As glicemias capilares a serem realizadas em casa serão custeadas pelo pesquisador desse projeto. O actígrafo (aparelho semelhante a um relógio de pulso), para medida do sono será fornecido sem ônus aos pacientes pelo período de duas semanas. Os exames de cortisol salivar e avaliação genética serão realizados sem ônus para os pacientes. Serão incluídos nesse projeto pacientes com DMT2 há mais de um ano, idade maior ou igual a 40 anos, história familiar de DMT2 e glicohemoglobina entre 7 e 10%. Serão excluídos desse estudo pacientes gestantes, pacientes em uso recente de corticoide (menos de 3 meses) ou outras medicações hiperglicemiantes, pacientes que apresentem condições que alterem significativamente a estabilidade glicêmica (como, e em casos de insuficiência renal, síndrome coronariana aguda recente e outras doenças como câncer, insuficiência hepática, entre outras). Serão excluídos, ainda, pacientes que se recusarem a participar dessa pesquisa em algum momento e aqueles que apresentarem diabetes descontrolado com sintomas de polidipsia, poliúria, perda de peso que demandem outras medidas como uso de insulina para o controle glicêmico, além de dieta, atividade física e medicações já em uso. Serão excluídos desse estudo pacientes com critérios de alto risco para apneia do sono grave, depressão e trabalhadores que alternam turnos de trabalho. Serão excluídos desse trabalho pacientes que apresentem epilepsia uma condição que pode se agravar com o uso da melatonina. De acordo com os proponentes, o objetivo primário do projeto é avaliar se a redução da variação da duração do sono implicará em redução da variabilidade glicêmica dos pacientes. Como objetivos secundários pretendem-se: • Avaliar se o uso da melatonina reduzirá a variação da duração do sono de pacientes com DMT2 • Avaliar se a resposta às intervenções visando a uma

maior regularidade do sono e da glicemia estão associadas a um ritmo de cortisol mais fisiológico. Objetivo da Pesquisa: 31.270-901 (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br Endereço: Bairro: CEP: Telefone: Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad Sl 2005 Unidade Administrativa II UF: MG Município: BELO HORIZONTE Página 02 de 04 UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS Continuação do Parecer: 4.259.257 • Avaliar se Genes relacionados ao relógio biológico determinam uma menor ou maior resposta ao uso da melatonina. De acordo com os proponentes, o uso da melatonina pode levar a sonolência excessiva diurna. A coleta de glicemias capilares pode levar a incômodos, pois trata-se de uma coleta em região distal dos dedos para se obter o sangue a ser colocado no aparelho glicosímetro. A coleta de material da saliva na região da mucosa oral pode gerar incômodo aos pacientes. Como benefício os autores relatam que os pacientes podem se beneficiar do projeto, obtendo uma maior regularidade do seu sono e também da sua glicemia. Avaliação dos Riscos e Benefícios: Pesquisa relevante para a área. Os pesquisadores relataram que o material biológico coletado será analisado imediatamente e não será guardado. Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Foram apresentados os seguintes documentos: folha de rosto assinada; projeto completo; parecer com aprovação da Assembleia Departamental; TCLE; Formulário de Informações Básicas; carta resposta. Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Não há. Recomendações: O projeto poderá ser aprovado, S.M.J. Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final). Considerações Finais a critério do CEP: 31.270-901 (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br Endereço: Bairro: CEP: Telefone: Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad Sl 2005 Unidade Administrativa II UF: MG Município: BELO HORIZONTE Página 03 de 04 UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS Continuação do Parecer: 4.259.257 BELO HORIZONTE, 04 de Setembro de 2020 Críssia Carem Paiva Fontainha (Coordenador(a)) Assinado por: Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados: Tipo Documento Arquivo Postagem Autor Situação

Informações Básicas do Projeto PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1513079.pdf 31/07/2020 15:13:58 Aceito Outros parecer.PDF 31/07/2020 15:13:33
WAGNER JOSE MARTORINA Aceito Outros RESPOSTA.pdf 31/07/2020 14:59:05
WAGNER JOSE MARTORINA Aceito TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência TCLE2.pdf 31/07/2020 14:57:57 WAGNER JOSE MARTORINA Aceito Folha de Rosto 1732020Folhaderostocassinaturas.pdf 16/04/2020 11:37:14 Almir Ribeiro Tavares Júnior Aceito Projeto Detalhado / Brochura Investigador projetocompleto.pdf 17/02/2020 22:12:17 Almir Ribeiro Tavares Júnior Aceito Situação do Parecer: Aprovado Necessita Apreciação da CONEP: Não 31.270-901 (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br
Endereço: Bairro: CEP: Telefone: Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad Sl 2005 Unidade Administrativa II UF: MG Município: BELO HORIZONTE Página 04 de 04

Apendices

APENDICE A - termo de consentimento livre e esclarecido

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do participante:

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa Variabilidade da duração do sono: um alvo terapêutico da melatonina para o controle glicêmico de pacientes com *diabetes mellitus tipo 2*. Pedimos a sua autorização para a coleta e análise imediata, sem armazenamento, de sangue e esfregaço de mucosa oral. A utilização do resultado da análise do seu material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se o/a Sr. (a) concordar em outros futuros. Nesta pesquisa pretendemos avaliar se o uso da melatonina pode ajudar a reduzir a variação da duração do sono e diminuir a variabilidade do controle glicêmico de pessoas que apresentam *diabetes mellitus* tipo 2.

Ao participar deste estudo o Sr (a) permitirá que o pesquisador utilize dados da entrevista médica, exame físico e exames de rotina do acompanhamento do seu diabetes. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone (31-992011539) do pesquisador do projeto (Wagner José Matorina) e, se necessário, através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG: 34094592

O Sr. fará uso de um comprimido de melatonina 3 mg a noite por pelo menos uma semana do estudo e na outra semana outra cápsula de um comprimido placebo, sem princípio ativo. O Sr (a) não estará ciente se a cápsula usada trata-se de placebo ou melatonina. Essa substância será disponibilizada sem custos pelo pesquisador do projeto. Essas cápsulas serão tomadas a noite duas horas antes do horário habitual de ir para cama. Além disso, responderá a alguns questionários sobre a sua doença (*diabetes mellitus*) e preencherá informações sobre os seus hábitos de sono em um diário, todos os 14 dias. Também realizará glicemias capilares (glicose medida por uma pequena picada na ponta do dedo por um aparelho chamado

glicosímetro) 6 vezes ao dia nos dias 3, 4 e 5 e 10, 11 e 12 do estudo. Fará também coleta de hormônios no sangue e de células da mucosa da bochecha. Esse material será levado ao instituto de ciências biológicas onde será feita análise genética imediata e depois descartado conforme todos os protocolos de segurança biológicos dessa instituição. O Sr (a) receberá orientações sobre dieta e atividade física no início da primeira semana e no início da segunda semana e responderá sobre a adesão a essa dieta no final da primeira e da segunda semana. Essa entrevista será realizada em um dos consultórios do pesquisador Wagner José Martorina. O seu sono será monitorado por meio de um aparelho semelhante a um relógio de pulso (actígrafo), durante as duas semanas.

Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios de Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Essa pesquisa envolve riscos relacionados a punção de veia periférica (discreto hematoma ou equimose subcutânea) no momento da coleta de sangue dos seus exames de rotina, minimizados com discreta compressão do local puncionado. Há também desconforto na coleta de material da mucosa salivar com um algodão, minimizado por uma coleta suave sem pressão na região e o desconforto de realização de picadas nas pontas dos dedos, glicemias capilares, minimizado pela orientação de que a parte lateral dos dedos apresenta menor dor ao contato com a agulha. Além disso há o desconforto em responder aos questionários dessa pesquisa, minimizado por uma entrevista objetiva por parte do pesquisador. O uso da melatonina pode causar discreta sonolência diurna. Porém, esse fato já está sendo minimizado pela baixa dose dessa substância usada nesse projeto, sendo incomum tal efeito nessas circunstâncias. A pesquisa contribuirá para avaliar se melhorar a regularidade da duração do sono pode melhorar a variação da glicemia de pacientes com diabetes mellitus tipo 2. O sr (a) se beneficiará diretamente da pesquisa, pois teremos um retrato da sua glicose em vários momentos do dia e em vários dias o que poderá se alvo da abordagem médica para o controle do seu diabetes.

Indiretamente o uso da melatonina poderá se mostrar eficaz em reduzir a variação da glicose o que poderá representar um benefício para todos os pacientes com diabetes, pois essas variações podem causar complicações crônicas da doença. Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o

direito à indenização. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, na rua Domingos Vieira 587 sala 1205, bairro santa Efigênia e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos (ou até 10 (dez) anos) na rua domingos Vieira 587, sala 1205, bairro Santa Efigênia e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa Variabilidade da duração do sono: um alvo terapeutico da melatonina para o controle glicêmico de pacientes com *diabetes mellitus tipo 2*, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome completo do participante
Data

Assinatura do participante

Nome completo do Pesquisador Responsável: Dr. Almir Ribeiro Tavares Junior

Endereço: Avenida Alfredo Balena 190, sala 235

CEP: 30.130-100 / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31) 34099458

E-mail: almirtav.bh@gmail.com

Assinatura do pesquisador responsável
Data

Nome completo do Pesquisador: Wagner José Martorina

Endereço: rua Domingos Vieira, 587, sala 1205, bairro Santa Efigênia

CEP: 30.150-240/ Belo Horizonte – MG

Telefones: (31)32417085

E-mail: wmartorina@yahoo.com

Assinatura do pesquisador (doutorando)

Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

APENDICE B – Dados clínicos**Dados gerais**

Nome:

Idade:

Sexo:

Profissão:

Escolaridade:

Dados não bioquímicos

Doenças crônicas

Trabalho em turnos sim () não ()

Tempo de diagnóstico de Diabetes mellitus tipo 2:

Medicações em uso:

Insulina: () sim () não

Número de hipoglicemiantes orais:

Uso de medicações indutoras do sono:

História familiar de DM2:

Stop bang

Exame físico:

Peso:

Altura:

IMC:

Circunferência abdominal:

Pressão arterial sistêmica:

Circunferência cervical

Dados Bioquímicos

Glicohemoglobina

APÊNDICE C – Artigo principal (Publicado : Nutrients)

GLYCEMIC VARIABILITY IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS (T2DM): THE ROLE OF MELATONIN IN A CROSSOVER, DOUBLE BLIND, PLACEBO CONTROLLED, RANDOMIZED STUDY.

Wagner Martorina ¹; Almir Tavares ^{1 2}

1 Neuroscience Program, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

2 Department of Mental Health, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Abstract: Background: Glycemic variability in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) may be associated with chronic complications of the disease. Melatonin is a hormone that plays a crucial role in biological rhythms. Previous studies have indicated that individuals with T2DM often exhibit reduced melatonin production. In this study, our objective was to investigate whether nighttime melatonin supplementation could mitigate glycemic variability in these patients. Methods: Crossover, double blind, placebo controlled and randomized study. A total of 30 patients were enrolled in this study. The study included 15 participants who followed the intervention sequence of placebo (7 days) - washout (7 days) – melatonin 3mg (7 days), and another 15 participants who followed the sequence of melatonin 3mg (7 days) - washout (7 days) - placebo (7 days). During the final three days of the first and third weeks, the participants measured their pre- and postprandial capillary blood glucose levels. This study was reported according to the CONSORT 2010 statement: extension to randomised crossover. Results: There was a significant absolute difference in the breakfast blood glucose levels ($p=0,016$) on the D7. The use of melatonin determined a greater positive variation between pre and postprandial glycemia than placebo. The difference in glycemic amplitude between post dinner D6 and pre breakfast D7 was also significantly higher in the melatonin group ($p=0.032$). Conclusions: Melatonin increased glycemic variability in individuals with type 2 diabetes mellitus (T2DM). These results can be attributed to the residual daytime effects of melatonin, effects prospective proximal and damage to the distal prospective effect of exogenous melatonin. Therefore, caution should be exercised when administering melatonin supplementation to patients with T2DM, taking into consideration factors such as dosage, duration of use and genetic considerations.

Keywords: diabetes mellitus, melatonin, glycemic variability, crossover, double blind, placebo- controlled, trial

1. Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a disease characterized by hyperglycemia, which, if not properly treated, can lead to acute and chronic complications such as amaurosis, lower limb amputations and renal failure[1].

The glycemic control of patients with T2DM is assessed using the glycohemoglobin molecule (HbA1c), which reflects the average blood glucose levels over the past three months. Patients with unstable glycemic control, experiencing both hyperglycemia and hypoglycemia episodes, may have misleading HbA1c results that appear to be within the target range[8]. This glycemic variability has been associated with negative outcomes in patients with T2DM[88] [89].

Recent studies have supported the hypothesis that a certain range of glycemic variation throughout the day, even with the nadir and peak of glycemia at the target, may contribute to chronic microvascular complications in T2DM, as occurs with chronic hyperglycemia.[9, 10]. Individuals with T2DM have increased glycemic variability compared to individuals without T2DM[18]. How to explain this condition?

Previous studies have attributed an increased risk of developing type 2 diabetes mellitus to sleep disturbances (disorders of quality, duration and sleep apnea)[90-92]. Furthermore, previous studies have shown that such disorders negatively impact the glycemic control of patients with diabetes mellitus[93-96]. In 2017, the American Diabetes Association recommended in its current guideline that patients with diabetes mellitus have their sleep pattern evaluated. The relationship between sleep and glycemic control has generated interest in melatonin, which is a hormone involved in sleep. Numerous studies have established a link between alterations in melatonin production and an increased risk of developing type 2 diabetes mellitus (T2DM)[19]. One study revealed that individuals with prediabetes and insulin resistance exhibit lower excretion levels of melatonin metabolites in their urine (6-sulfatoxymelatonin)[20]. Numerous studies have also investigated the relationship between

polymorphisms in the gene responsible for expressing melatonin MTNR1B receptors and an elevated susceptibility to developing type 2 diabetes mellitus (T2DM) and circadian disorders.[21, 22]. Melatonin is a hormone that signals the circadian rhythm. Rhythm not only related to sleep- wake cycle, but also the rhythm patterns associated with hunger, satiety, increased alertness and disposition for activities during the day[31]. One hypothesis is that melatonin would be involved in the rate at which our blood glucose levels fluctuate throughout the day. Its nocturnal production would determine a diurnal schedule of the rhythm of hormones such as insulin and also counter-insulin hormones: cortisol, growth hormone, catecholamines[26] that can modulate glycemic variability. Multiple studies investigating the relationship between type 2 diabetes mellitus (T2DM) and melatonin have explored the potential benefits of melatonin supplementation in improving glycemic control among these patients. The role of melatonin in glycemic control, however, seems poorly understood or simply misunderstood. This statement is supported by the divergence in studies between exogenous melatonin and HbA1C levels and as well as main role played by this hormone in regulation of the circadian rhythm[33] and as an anti-inflammatory substance that may have beneficial actions in pancreatic beta cell dysfunction and insulin resistance[44, 97]. It is possible that the role of melatonin is more associated with variability, with the rhythm of glucose, than with glycemic control.

Melatonin is a complex molecule, whose feedback is not as simple as that of other hormones. It is necessary to understand well the physiology of endogenous melatonin and also the pharmacology of exogenous melatonin in order to establish its relationship with the diurnal rhythm of glucose levels throughout the day. Another important point is to define the concept of glycemic variability. There are several ways to assess whether a patient has an abnormal variation in their blood glucose or not. These differences may simply be conceptual, based on various mathematical calculations, or technological, as there are different ways of measuring a patient's blood glucose, some using cutting-edge technologies, with high costs[36].

To evaluate the role of exogenous melatonin in glycemic variability in patients with T2DM, we developed a crossover, double blind, placebo controlled and randomized study. Before detailing the design of the work, some concepts will be detailed, such as: glycemic variability and characteristics of endogenous and exogenous melatonin.

2 Materials and methods

This study was reported according to the CONSORT 2010 statement: extension to randomised crossover[70].

2.1 Objectives

2.1.1 The main objective

The primary objective of this study was to verify whether melatonin alters the glycemic variability of patients with T2DM.

2.1.2 Specific objectives

As a secondary outcome, we evaluated whether the disparity between postprandial (after-meal) and preprandial (before-meal) blood glucose levels of the fasting, lunch and dinner, separately, could be altered by the use of melatonin. This evaluation aims to determine whether melatonin use has any impact on glucose fluctuation at specific times of the day.

In order to analyze the effect of melatonin after a greater number of days of use, we analyzed the glycemic variability obtained on the last day of measuring capillary glycemic levels.

We also conducted an analysis of the glycemic variation coefficient (standard deviation / mean glycemic value) of capillary blood glucose levels during the administration of placebo and melatonin. We will consider the condition stable if this value is below 36% and unstable if it exceeds this threshold. Furthermore, we will evaluate whether there was a statistically significant difference in the glycemic variability coefficient obtained from each patient between the use of melatonin and placebo.

Finally, we evaluated whether the use of melatonin altered the glycemic variability between the post dinner of D6 and pre breakfast of D7.

2.2 Study design

This crossover, prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled study was approved by the ethics committee of the Federal University of Minas Gerais (CAAE: 31990720.7.000.5149) and registered in the Brazilian registry of clinical trials under code RBr-6wg54rb. Participants involved in this study signed an informed consent form that was prepared in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol for this study has been accepted for publication by the JMIR research protocols. The abstract and the preprint are already available on pubmed[98]. The study was carried out in an endocrinology clinic managed by the research physician (WM), in the city of Belo Horizonte, Brazil. Thirty patients participated in this work. These patients were randomized into 2 groups: the placebo-washout-melatonin 3 mg group, which received placebo for 7 days, followed by 7 days without study medication (washout period) and followed by 7 days of melatonin 3 mg; or, alternatively, the melatonin 3mg-washout-placebo group, which received melatonin for 7 days, followed by 7 days off study medication (washout period) and followed by 7 days on placebo. When allocating the 15 patients, they were assigned to one of the two possible intervention orders: either placebo followed by melatonin or melatonin followed by placebo. The remaining 15 patients were then assigned to the intervention order that had not been completed yet. Patients were instructed to use placebo or melatonin 3 mg at 9 pm. On the 5th, 6th and 7th day of the first week and on the 5th, 6th and 7th day of the third week, the patients underwent fasting capillary blood glucose monitoring, 2 hours after breakfast, before lunch, 2 hours after lunch, before dinner and 2 hours after dinner. No guidance on the timing of each meal was given to patients. Our aim was not to influence the natural habits of the participants. We know, however, that in Brazil breakfast takes place around 7:00 am, lunch around 12:00 pm and dinner around 7:00 pm. The first day of melatonin or placebo use at night was considered D0.

2.3 Blinding

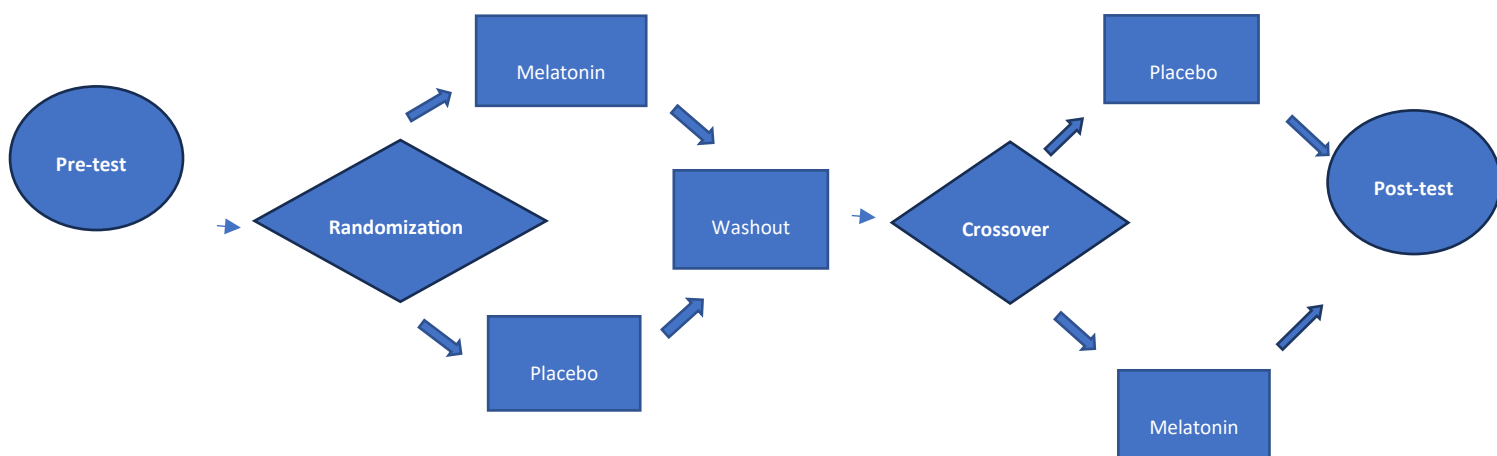
Vials containing melatonin and placebo were numbered 1 and 2, not necessarily in that order. The person responsible for assigning the numbers was the only person with knowledge of which vials contained melatonin and which contained placebo. This person did not participate in any other phase of the study. All other people involved in this project (patients, medical researchers, statisticians and assistants) were blind to the substances contained in each vial. Upon completion of the statistical analysis, the researchers were informed which vial contained melatonin and which contained placebo. The melatonin and placebo capsules were manipulated in the artisanal pharmacy in Belo Horizonte, production

batch 0630/0122. Melatonin was imported from wuxi cim science, China, batch CS-MEL-210615. The placebo was composed of aerosil + starch + micronized cellulose + talc. The capsules, both for placebo (bottle 2) and melatonin (bottle 1) were identical in terms of color (white), smell (odorless) and shape, making it impossible to distinguish which capsule was melatonin and which was placebo. The vials were also identical except for the numbering.

2.4 Randomization

Patients were randomized into two groups: 1) placebo-melatonin-washout and 2) melatonin-washout-placebo. This division was carried out according to the result of throwing a dice. Those who drew a number from 1 to 3 went to group 1 and those who drew numbers from 4 to 6 went to group 2. The project researchers were aware of which patients used vial 1 or 2 in the first and third weeks, but they did not know which vial contained the placebo and which contained melatonin until data analysis was completed.

2.5 Flowchart (Figure 1)



2.6 Sample size

The initial sample size was thirty patients. As referenced in the literature, when we do not know the standard deviation and population frequencies of a given variable, a pre-test should be performed with 30 to 40 patients and consider the behavior of this group as a population estimate[71]. After collecting data for the first and third weeks, we computed the standard deviation (SD) of the differences between pre- and postprandial glucose levels, both overall and for each meal, in the placebo and control groups. We established that any variation

exceeding 1 SD in comparison to the placebo group would be considered significant for our calculations. We determined the required sample size (n) based on the different objectives of the study, and the largest n we found was 17 patients. If we increase the threshold for the detectable SD value, we could potentially reduce the necessary sample size even further.

2.7 Participants

3.5.1.1 Inclusion criteria

The following were included[99] in this project: (1) patients with T2DM for more than one year, (2) age greater than or equal to 40 years, (3) family history of T2DM and (4) glycohemoglobin between 7 and 10%.

3.5.1.2 Exclusion criteria

The following were excluded from this study: (1) pregnant women, (2) patients in recent use of corticosteroids (less than 3 months) or other hyperglycemic drugs, (3) patients who had conditions that significantly alter glycemic stability (such as in cases of renal failure, recent acute coronary syndrome and other diseases such as cancer, liver failure, among others). Also excluded were (4) patients who refused to participate in this research at some point and (5) those who had uncontrolled diabetes with symptoms of polydipsia, polyuria, weight loss requiring other measures for glycemic control, in addition to diet, physical activity and medications already in use. This study excluded (6) patients with high-risk criteria for severe sleep apnea, (7) depression and (8) workers who alternated work shifts and (9) patients who had epilepsy, a condition that can be aggravated by the use of melatonin.

2.8 Instruments

2.8.1 Exogenous melatonin

The pharmacokinetics of exogenous melatonin is influenced by several variables: dose, formulation (slow release, immediate release, slow release with sustained peak), age, hepatic metabolism, time of use. In light of this, studies on half-life, time to peak, and peak values have yielded conflicting results.[58-60].

Gooneratne, et al. compared the half-life of slow-release and sustained-peak melatonin at 0.4 mg and 4 mg[58]. In this work, the time to peak, half-life, clearance and melatonin

distribution were similar in both formulations. However, melatonin values at the 4 mg dose during the peak were higher than those of endogenous melatonin. This may be a risk factor for maintaining supraphysiological doses of melatonin during the day, when this hormone, due to the action of sunlight, should reduce its concentration.[58]. These results are similar to those of studies with rapid release melatonin [60].

A better understanding of the physiology and role of endogenous melatonin will allow the development of preparations capable of mimicking this action and promoting the proper use of this substance in clinical practice. In this work, we used a dose of 3 mg of melatonin, as this is the dose most frequently used by the population.

2.8.2 Assessment of glycemic variability

There is no gold standard for the assessment of glycemic variability[18]. All methods for this purpose have some type of failure. The main is to omit blood glucose variations that occur between two measurements. In this work we included a simple methodology which was the coefficient of glycemic variability, which is the standard deviation divided by the glycemic mean. This method is validated by the literature. In addition, we calculated the glycemic variability that occurs between pre and post prandial breakfast, lunch and dinner. The glycemic variability that occurs between close measurements is of great importance due to the speed of this oscillation. In fact, a glycemia that varies rapidly between two moments is capable of triggering a series of counter-regulatory hormonal events, in order to maintain homeostasis. In this sense, we believe that the inflammatory power of the variation between pre- and postprandial is greater than that between two preprandial glycemia (for example: pre-breakfast and pre-lunch glycemia). The calculation was performed in two ways: considering the amplitude of the difference (postprandial glucose minus the preprandial glucose). In this case, the increase or decrease in glucose by x mg/dL did not change the sign of the result, as this value was always considered positive (delta or amplitude). The other calculation method was the difference between postprandial minus preprandial, and negative values was included in the analysis (real difference). This latter analysis seems to be significant, as prioritizing the positive or negative increment of capillary blood glucose variation is crucial. Indeed, the inflammatory potential of postprandial hyperglycemia for microvascular complications is more widely recognized than that associated with hypoglycemia. In order to evaluate the effect of melatonin

on nocturnal glycemic variability, we also calculated the difference between post-dinner and pre-breakfast glycemia between D6 and D7.

2.8.3 Study variables

The clinical variables of the study will be obtained through a systematic anamnesis. The following variables were included: age, sex, body mass index, insulin usage, profession, education, presence of chronic diseases, shift work status, and duration since T2DM diagnosis, medications in use, use or not of insulin, use or not of sleep-inducing medications, family history of T2DM, abdominal and cervical circumference, blood pressure. HbA1C was obtained from all patients. We limited our sample to patients with glycohemoglobin between 7 and 10%. In fact, greater glycemic variability is found in patients with a higher HbA1C value. Therefore, we did not include those with glycohemoglobin < 7%. However, in order to have a homogeneity of glycemic variability in all patients, we limited the maximum value of HbA1C to enter the study to 10%. We subsequently evaluated whether patients who were randomized to the intervention in the melatonin 3mg-washout-placebo order had mean HbA1C values different from those who were randomized to the placebo-washout-melatonin 3mg order.

Creation of study variable

Main objective

A general variable (GV) was obtained by averaging the sum of the difference in blood glucose after breakfast (AB) and before breakfast (BB), after lunch (AL) and before lunch (BL), after dinner (AD) and before dinner (BD), on the last three days of placebo and melatonin use in the study (D5, D6, D7) and dividing this result by 3. [100]

Formula: $\{[(ABD5 - BBD5) + (ABD6 - BBD6) + (ABD7 - BBD7)] / 3 + [(ALD5 - BLD5) + (ALD6 - BLD6) + (ALD7 - BLD7)] / 3 + [(ADD5 - BDD5) + (ADD6 - BDD6) + (ADD7 - BDD7)] / 3\} / 3$.

We obtained two different variables: real difference, considering negative values and positive and another considering only positive values in the calculation (delta or amplitude).

Specific objectives

We analyze separately the mean of differences between placebo and melatonin, in the breakfast, in the lunch, and in the dinner, of the last three days of the study.

We also created the same variables (general and specific) considering only the seventh day. The general variable was obtained as follows

$$[(ABD7 - BBD7) + (ALD7 - BLD7) + (ADD7 - BDD7)] / 3.$$

Specific variable D7 was obtained as follows

$$ABD7 - BBD7 \text{ (breakfast) and } ALD7 - BLD7 \text{ (lunch) and } ADD7 - BDD7 \text{ (dinner).}$$

In addition, we calculated the mean glycemic variability coefficient for each patient when using placebo and melatonin. The glycemic variability coefficient was calculated by dividing the standard deviation by the mean.

Finally, we calculated the difference between post-dinner of D6 and pre-breakfast glycemia of D7. In this case, we also calculated the delta and the real difference. This variable was obtained as follows

$$(ADD6 - BBD7)$$

We used the STOP-BANG[79] questionnaire for obstructive sleep apnea screening. Patients at high risk of obstructive sleep apnea (STOP-BANG score > 4) were excluded from the study, given the prior influence of this disease on glycemic control. The cutoff point of 4 was used in order to have more specificity in the exclusion of patients with obstructive sleep apnea.

2.8.4 Statistical analysis

Quantitative variables with Gaussian distribution had their central tendency expressed as mean and their dispersion quantified by standard deviation. For variables with non-normal distribution, central tendency was described by the median and its dispersion by the 25% and 75% quartiles. The Shapiro-Wilk test was used to assess normality. Categorical variables were presented using absolute frequency and percentage.

Statistical analyzes for normal quantitative variables, before and after the intervention, were performed using the paired t test. When the distribution is not normal, the Wilcoxon test will be used.

Patients were compared with each other based on capillary blood glucose results obtained during the first and third weeks.

The epidemiological, clinical and laboratory data of the patients were compared between groups 1 and 2, in order to assess whether the randomization process generated similar groups from a statistical point of view.

The significance level used was 0.05, with SPSS version 20.0 being the software of choice.

3 Results

30 patients participated in this work. 15 of them underwent the intervention in the order placebo – washout- melatonin and another 15 melatonin -washout -placebo. Table 1 presents the epidemiological and clinical data of the patients by order of intervention. Our group consisted of patients with a mean age of over 60 years. Mean time of diagnosis of 13 years and obesity, as the median body mass index was > 30 . The patients in this study had good median glycemic control: HbA1C around 7.3%. The 75th percentile had an HbA1C of 8.10%, indicating homogeneity in the glycemic control of these patients. This data is significant as it highlights that higher HbA1C levels correspond to increased glycemic variability among patients. There was no difference between the use or not of insulin between the two intervention sequences. This data is of great importance, as patients using insulin may have greater glycemic variability. Only 9 patients in our sample used insulin. The data in this table were chosen to characterize our group of patients and also to assess whether the randomization was adequate. As the p-value was above 0.05 in the comparison of both intervention sequences, we can conclude that the randomization of patients was adequate.

Table 1: Epidemiological datas of the groups placebo-wasout-melatonina and melatonina- washout- placebo

Variables	Melatonin→placebo n=15	Placebo→ melatonin n=15	Total n=30	Value -p
Age (mean +/-SD)	62,27±8,20	61,87±10,95	62,07±9,51	0,911 ¹
Gender n (%)				
Feminine	9 (56,2%)	7 (43,8%)	16 (100,0)	0,464 ³
Masculine	6 (42,9%)	8 (57,1%)	14 (100,0)	
Education n (%)				
Elementary	0 (0,0)	3 (100,0)	3 (100,0)	0,143 ⁴
School	5 (45,5)	6 (54,4)	11 (100,0)	
faculty	10 (62,5)	6 (37,5)	16 (100,0)	

DMT2 diagnosis time				
Mean+/- SD	13,20±7,66	14,13±7,94	13,67±7,68	0,745 ¹
Index of body mass				
Mean+/- SD	30,06±5,63	31,55±6,10	30,81±5,81	0,494 ¹
Glycohemoglobin				
Median (Q1;Q3)	7,30 (7,10 -8,10)	7,3(7,00 - 8,40)	7,30(7,10-8,10)	0,723 ²
Insulin use n (%)				
Yes	2 (22,2%)	7 (77,8%)	9 (100,0)	0,109 ⁴
No	13 (61,9%)	8 (31,1%)	21 (100,0)	

1 T test; 2 Mann Whitney test; 3 Asymptotic Pearson's chi-square test; 4 Exact Pearson's chi-square test; 5 SD standard deviation; Q1 quartile 25%; Q3 quartile 75%

Table 2 analyze the real difference between postprandial and preprandial glucose levels as described in the study variable. In this case, it is important to note that some values can be negative. Some patients may have a lower postprandial glucose level compared to their preprandial glucose level, resulting in a negative difference.

The comparison between the placebo and melatonin groups showed no significant difference in the overall mean of the three days of capillary glucose measurements ($p=0.805$). Additionally, there was no difference in the means or medians when separately analyzing glucose levels during breakfast, lunch, and dinner across the three days of measurements ($p>0.05$). Interestingly, the p-value increased as the measurements moved further away from the morning period. This indicates that the positive increment of glycemic variability assessed by this methodology becomes less significant between the placebo and melatonin groups as we move away from the morning period.

The comparison of glucose levels on the seventh day, however, revealed a significant difference during breakfast ($p = 0.016$). The average glycemic variation in the melatonin group was higher than in the placebo group. Therefore, the positive increment of glycemic variability during the breakfast meal was greater with the use of melatonin compared to the use of placebo. This difference can also be seen in Figure 2. There was no significant difference between the placebo and melatonin groups during lunch and dinner on the third day. Similarly to the overall analysis of glucose levels across the three days of measurements, we observed that the p-value increased moved further away from breakfast.

Table 2: Analysis of the real difference between post and pre prandial

Q1 quartile 25%; Q3 quartile 75%; D7 seventh day

Variation of analyzed glucose (post-pre-prandial difference)	Placebo	Melatonin	Value-p
General (Median(Q1-Q3))	29,16 (11,63-36,66)	25,88 (15,30-45,19)	0,805
Breakfast (mean+/standard deviation)	31,47 +/-35,30	45,5 +/-39,85	0,058
Lunch (Median(Q1-Q3))	25,83 (66,66-52,66)	22,33(7,66-42,83)	0,57
Dinner meals (mean+/standard deviation)	24,34 +/-32,22	19,41+/-36,45	0,58
Breakfasts in D7 (Median(Q1-Q3))	26 (-7 - 58,25)	37,5 (27,25 – 64,25)	0,016
Lunch on D7 (mean+/standard deviation)	25,0 +/- 47,14	33,13 +/- 50,67	0,362
Dinner on D7(mean+/standard deviation)	15,16 +/-40	15 +/- 39,46	0,98
General D7 (mean+/standard deviation)	20,33(8,0-42,0)	27,5 (9,0-47,5)	0,077
Night and day difference (mean+/standard deviation) D6-D7	23,7 +/- 35,48	44,80 +/- 50,95	0,078

Figure 2 Difference between post and preprandial breakfast glycemia in D7

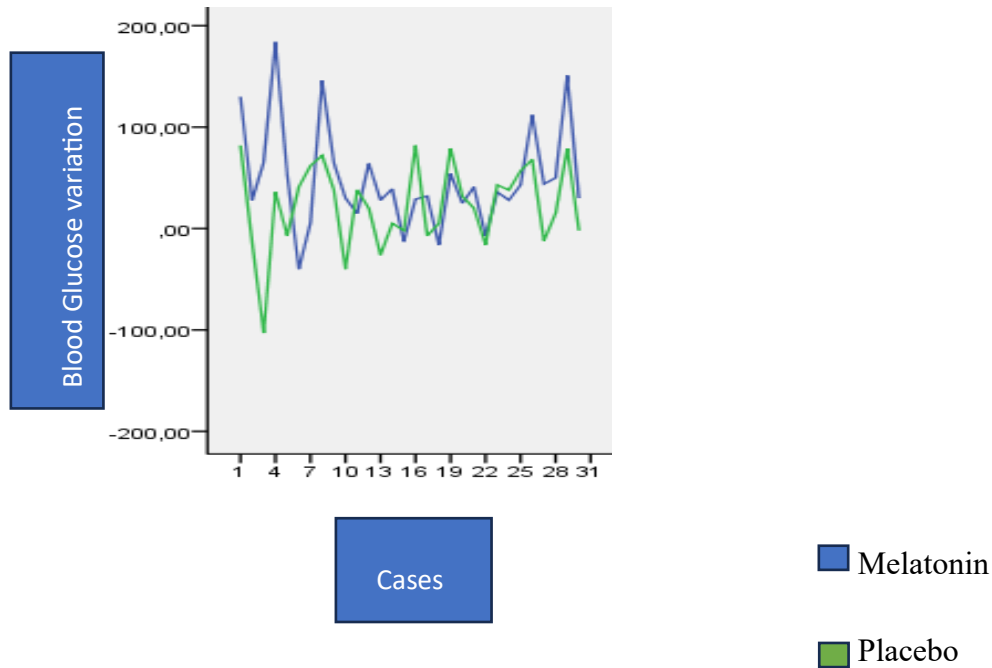


Table 3 presents the glycemic variability data according to the delta between the postprandial and preprandial glycemia difference. For example: a patient who had his preprandial glycemia of 100 mg/dl and postprandial of 120mg/dl, with the use of melatonin, had a variation of 20mg/dl in capillary glycemia. If, at the time when this patient used placebo, the variation was from 100 mg/dl in the preprandial to 80 mg/dl, that is, 20 mg/dl, we consider that there was no variation even though the postprandial glycemia was lower. Our analyzes did not show any statistically significant difference between pre and post prandial measures. However, what draws attention is the $p = 0.051$ on the seventh day at breakfast, close to statistical significance, but without being able to confirm its presence. Between the post-dinner glycemia on the sixth day and pre-breakfast on the seventh day, there was a significant greater range of glycemia ($p=0,032$). The table 3 and figure 3 illustrates this result.

Table 3: Analysis of the delta or Amplitude of the difference between post and pre prandials

Variation of analyzed glucose (Delta)	Placebo	Melatonin	Value -p
---------------------------------------	---------	-----------	----------

General (Median(Q1-Q3))	38,22 (29,94-55,75)	37,94(29.27-56,16)	0,829
Breakfast (Median(Q1-Q3))	33,66 (21,25-67,58)	44,5 (28-68)	0,102
Lunch (Median(Q1-Q3))	42,33 (24,83-58,91)	36,5 (2,83-49,08)	0,44
Dinner (mean+/-standard deviation)	37,60 +/- 22,60	36,21+/- 25	0,86
Breakfast D7 (Median(Q1-Q3))	37 (12,7-63,5)	39,5 (28-64,25)	0,051
Lunch D7 (Median(Q1-Q3))	34 (20,75 – 71)	35 (21,75 – 70,5)	0,267
Dinner D7 (Median(Q1-Q3))	30,5 (10- 50)	21,5 (9,5- 42,25)	0,558
General D7 (Median(Q1-Q3))	37 (23,5-50,4)	37,3(26,66-52,16)	0,29
Night and day difference D6-D7(mean+/-standard deviation)	32,16 +/- 27,80	52,26 +/- 42,97	0,032

D7: Seventh day; Q1 quartile 25%; Q3 quartile 75%

Figure 3 Delta or Amplitude of the difference between postprandil D6 and preprandial D7

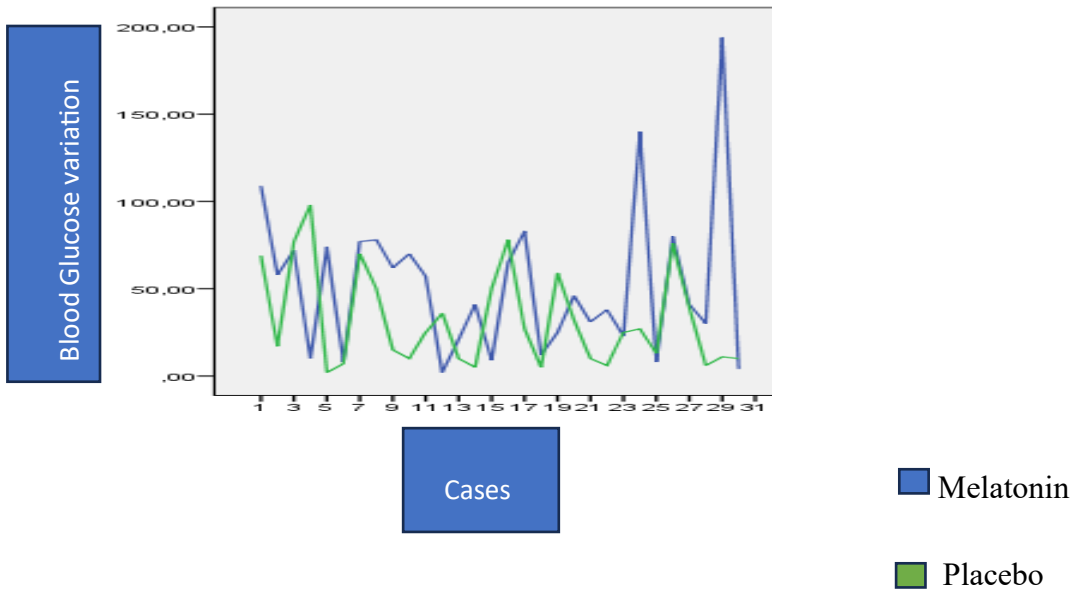


Table 4 presents the results of the glycemic variation coefficient, given by the standard deviation divided by the mean. This data is well validated by the literature for the assessment of glycemic variability. We found no significant differences in this data when comparing the placebo and melatonin groups, as seen by $p > 0.05$.

Table 4: coefficient of glycemic variability (standard deviation/mean) of the placebo and melatonin groups

Glicemic variability	Placebo	Melatonin	Value- p
Glycemic variability coefficient (Median(Q1-Q3))	22,36% (18%-28%)	24,52% (18,7-28%)	0,098

Q1 quartil 25%; Q3 quartil 75%

We also performed an exploratory analysis of our database between patients who used insulin and those who did not use insulin. In this analysis, it was found that in patients who did not use insulin, the glycemic variability by delta value (ignoring whether positive or negative) on seventh day of breakfast was significantly greater when melatonin was used than when

placebo was used ($p=0.05$). At the same time, at lunchtime, the group that used melatonin had a lower glycemic variability delta than the placebo group, even considering the average of the 3 days at that time ($p=0.049$).

4 Discussion

This was the first randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study to assess the role of melatonin on glycemic variability in T2DM patients. In this work, we were able to demonstrate that melatonin 3mg, taken at 9:00 pm, compared to placebo increased the glycemic variability of these patients on the seventh day (D7). In addition, there was a greater amplitude (delta) of glycemic variability between post-dinner and pre-breakfast glycemia between D6 and D7 in patients who used melatonin. There was not difference in the coefficient of glycemic variability between placebo and melatonin. These results are different from what was initially hypothesized in the study. Melatonin is considered a hormone that regulates circadian rhythm. We expected, therefore, that its use could reduce glycemic variability in patients with type 2 diabetes and not increase it. How can we explain the results found here?

Some theories may explain the positive increase in melatonin between pre and post breakfast on the seventh day. The effects of exogenous melatonin expected in this study are those related to the absence of this hormone during the day. Capillary blood glucose levels were measured during the day and melatonin taken at night. Prospective effects of melatonin occur when its concentrations are low or undetectable. One type of prospective effect of melatonin is the proximal, which occurs after this substance reduces its concentration in the morning. Nocturnal inhibitory effect of melatonin on G protein-coupled receptors ends in the morning. This deactivation of the receptor generates a rebound effect of hypersensitivity in the intracellular pathway of adenylyl cyclase/cAMP/PKA/CREB [38]. The hyperactivation of the pathway could increase the concentration of insulin counter-regulatory hormones: growth hormone, catecholamines and cortisol, for example. In a patient who has melatonin deficiency such as those with T2DM is likely an upregulation of G protein-coupled receptors. The sudden increase of exogenous melatonin could potentially cause greater inhibition of this pathway during the night, leading to a rebound effect of hypersecretion of hormones that is even more pronounced than the physiological in the morning. Consequently, we would observe a greater elevation in insulin resistance. The longer half-life of exogenous melatonin could delay this

rebound effect to the postprandial period, justifying greater glycemic variability, resulting in higher glycemic variability, as seen on the seventh day of our study during breakfast. Although there may be an increase in insulin secretion through this same mechanism, which could potentially lead to a lesser rise in postprandial glucose levels, we believe that the rebound effect on various hormones that antagonize the action of insulin would be more predominant. In addition, possible residual effect of melatonin in the morning may have shifted the rebound effect of melatonin from fasting to post-breakfast.

Higher doses of melatonin used during the night may lead to a residual effect of this hormone beyond the nighttime period.[58] Melatonin can worsen glycemic control when its concentration is elevated during the day or meal times, by increasing insulin resistance and reducing insulin secretion[23] This could explain the greater positive variation in breakfast glycemia. In this study was used a dose of 3 mg of melatonin, which is the most used dosage in commercial preparations of this product. However, lower doses ranging from 0.1 to 0.5 mg have been recommended when the objective is to use the medication as a chronobiotic. [85] Larger doses have been used for sleep disorders such as insomnia, but without a well-defined role and with occasional and residual effects[86].

The second result of this work demonstrated an increase in the amplitude between post-dinner D6 and pre-breakfast glycemia. It can be explained by the prospective distal effects of melatonin. Melatonin acts directly to suppress the activity of the Clock/Bmal1 complex. A prolonged inhibitory effect on this complex due to a non-physiological effect to exogenous melatonin could lead to an abnormal synchronization of the biological clock, making the variation in blood glucose during the night erratic.

Another important factor that may influence the results of glycemic variability in studies on melatonin and T2DM is the melatonin receptor polymorphism MTNR1B rs10830963. Some works demonstrate that the mutation of this common receptor in patients with T2DM may predispose to a worse glycemic response with the use of melatonin[24]. Our work was carried out with T2DM patients and family history of this disease. These patients are at increased risk of the mutation that predisposes to a worse glycemic response to the use of melatonin. Recent work has shown that the presence of this mutation determines a reduction in insulin secretion

in the presence of melatonin on patients who have a habit of having dinner late at night when melatonin levels are already high[23].

The variation in glycemia delta (post minus pre-breakfast) on the seventh day of the study showed a p-value of 0.051, indicating a strong trend towards significance. This result can be explained why postprandial hyperglycemia is usually greater than preprandial and, therefore, a good part of the analyzed data were similar to those evaluated considering the negative values of the difference that were significant in the seventh day. However, a data that may have interfered with this result was the inclusion of patients using insulin in the studies. A stratified analysis showed that the variation in glycemia by delta was significantly higher in patients who were not using insulin. It is possible that the power of insulin on glycemic variability was a bias for the effect hyperglycemic of melatonin in the morning, according to this analysis. In the same stratified analysis, the use of melatonin in patients who did not use insulin reduced postprandial incursions even considering the mean glycemic variation of the three days. We believe that at lunchtime the proximal prospective effect of melatonin, which increases insulin resistance, is lower, allowing a positive effect of melatonin on the glycemic variability measured by the delta. Furthermore, the chance of having an increased serum concentration of melatonin at that time is lower, and we would not have the negative influence of the MTNR1B receptor mutation described. In this sense, we believe that the prospective distal effect of the use of melatonin becomes evident, with a better regulation of the variation in glycemia at this time. This effect is related to the direct regulation of clock genes. These conclusions, however, are merely exploratory, as the previous study design did not exclude patients using insulin.

In this work, we cannot define whether a greater positive variation in blood glucose at breakfast after 7 days of using melatonin 3 mg was a positive or negative event. As the glycemic variability of our patients was small, a statistically significant increase in postprandial glycemia in the morning may not represent an inadequate clinical result. In fact, the physiological is that the postprandial glycemia has a elevation of at least one standard deviation. A lower elevation may represent a problem for T2DM patients, exposing them to the risk of hypoglycemia by the frequent use of medications with greater hypoglycemic power. In this sense, we can hypothesize that melatonin supplementation may have reestablished a more physiological pattern of glycemic elevation in these patients, with eventual benefit from the point of view of protection

against hypoglycemia. A greater amplitude of variation of post-dinner glycemia on D6 compared to pre-breakfast on D7 can be considered a negative result of the use of melatonin. Glucose variation with an average of more than 50 mg/dl during melatonin use is considered an inadequate glucose variation.

Theoretically, exogenous melatonin could be incorporated into the therapeutic arsenal of patients with insomnia. As we age, these disorders become more prevalent, which could be associated with the decline in serum levels of this hormone as well as its physiological cyclicality.[61]. Furthermore, it is worth noting that melatonin does not exhibit the typical sedative effects commonly seen with benzodiazepines.[62] Despite this, this substance does not seem to work well as a hypnotic drug. Studies on melatonin and insomnia show conflicting results [63]. For this reason, we did not assess patients' sleep habits in this work. However, we excluded patients who worked shifts, as in this case melatonin could have a strong influence on their sleep habits and influence blood glucose for this reason. The role of exogenous melatonin seems more related to its action as a chronobiotic [64, 65] and anti-inflammatory[97]. Its use, then, has been aimed at circadian rhythm disorders caused by jet lag syndrome or for workers who alternate work shifts. [66-68]. Previous studies demonstrate that the use of this substance for 5 days was able to resynchronize the biological rhythm, causing a phase advance of up to 2 hours [69]. This data can be demonstrated in our study because the effects of melatonin on glycemic variability appeared after 7 days of use.

Our work presents some critical points. The coefficient of glycemic variability both when the patients used placebo and when they used melatonin was similar and small, less than 36% in most cases. This data may be related to the fact that the patients had a glycemic average practically at the target, as verified by the general average of HbA1C, which was around 7.3%. The low glycemic variability observed in our study may have concealed a potential effect of melatonin on glucose variation. Another criticism of our study is the fact that the duration of melatonin use was only 7 days. Prolonged use may lead to different outcomes regarding glycemic variability. Finally, we did not assess the presence or absence of the MTNR1B gene mutation or the melatonin concentration of our patients. There was a mere assumption that they would have this mutation more often and would be melatonin deficient because they have T2DM.

The positive points of this study are also relevant. The fact that it is a double-blind, placebo-controlled, randomized study gives the results of this study greater methodological validity. Furthermore, the results found in this study can be explained by the physiology of melatonin. Finally, this study was carried out in a real-life context. For example, as the aim of the study was to assess the chronobiotic effects of melatonin on glycemic variability, no guidance on dietary timing was given to patients. This implies that the results of this can therefore be used in everyday clinical practice.

5 Conclusion

This study concluded that 3 mg melatonin supplementation at night increases the glycemic variability of pre- and post-prandial breakfast glycemia and post-dinner glycemia in relation to fasting glycemia. Factors related to the physiology of melatonin, such as residual daytime effects of melatonin, effects prospective proximal, damage to the distal prospective effect of exogenous melatonin and patients' genetic characteristics, may explain the results of this work. It is possible that exogenous melatonin, in smaller doses, with less risk of residual effects in the morning, has a different action on glycemic variability. Future studies, with lower doses of this hormone and for a longer period of time are necessary to better evaluate the role of this hormone in the glycemic variability of patients with T2DM.

6 Acknowledgements

We would like to thank the staff at the outpatient clinic where the data for this study were collected for their support with the medical consultations.

7 Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

6 References

1. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, et al. 3. Prevention or Delay of Type 2 Diabetes and Associated Comorbidities: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care*. Jan 1 2023;46(Suppl 1):S41-S48. doi:10.2337/dc23-S003
2. Lorenzo-Medina M, de la Iglesia S, Ruiz-Garcia L, Quintana-Hidalgo L, Martin-Alfaro R, Herrada J. Pitfalls of glycosylated hemoglobin in the glycemic assessment of diabetes patients with hemoglobin

- louisville: role of serum fructosamine. *J Diabetes Sci Technol*. May 1 2013;7(3):804-5. doi:10.1177/193229681300700329
3. Battelino T, Dovc K. Glycemic Variability: The Danger of a Physiologically Stable Metric. *J Clin Endocrinol Metab*. Oct 1 2020;105(10):e3815-7. doi:10.1210/clinem/dgaa486
 4. Cheng D, Fei Y, Liu Y, Li J, Xue Q, Wang X, Wang N. HbA1C variability and the risk of renal status progression in Diabetes Mellitus: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(12):e115509. doi:10.1371/journal.pone.0115509
 5. Chatziralli IP. The Role of Glycemic Control and Variability in Diabetic Retinopathy. *Diabetes Ther*. Feb 2018;9(1):431-434. doi:10.1007/s13300-017-0345-5
 6. Firouzabadi MD, Poopak A, Sheikhy A, et al. Glycemic profile variability: An independent risk factor for diabetic neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Prim Care Diabetes*. Feb 2023;17(1):38-42. doi:10.1016/j.pcd.2022.11.011
 7. DeVries JH. Glucose variability: where it is important and how to measure it. *Diabetes*. May 2013;62(5):1405-8. doi:10.2337/db12-1610
 8. Cappuccio FP, D'Elia L, Strazzullo P, Miller MA. Quantity and quality of sleep and incidence of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*. Feb 2010;33(2):414-20. doi:10.2337/dc09-1124
 9. Hein M, Lanquart JP, Loas G, Hubain P, Linkowski P. Prevalence and risk factors of type 2 diabetes in insomnia sufferers: a study on 1311 individuals referred for sleep examinations. *Sleep Med*. Jun 2018;46:37-45. doi:10.1016/j.sleep.2018.02.006
 10. Botros N, Concato J, Mohsenin V, Selim B, Doctor K, Yaggi HK. Obstructive sleep apnea as a risk factor for type 2 diabetes. *Am J Med*. Dec 2009;122(12):1122-7. doi:10.1016/j.amjmed.2009.04.026
 11. Pamidi S, Aronsohn RS, Tasali E. Obstructive sleep apnea: role in the risk and severity of diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. Oct 2010;24(5):703-15. doi:10.1016/j.beem.2010.08.009
 12. Martorina W, Tavares A. Real-World Data in Support of Short Sleep Duration with Poor Glycemic Control, in People with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res*. 2019;2019:6297162. doi:10.1155/2019/6297162
 13. Sakamoto R, Yamakawa T, Takahashi K, et al. Association of usual sleep quality and glycemic control in type 2 diabetes in Japanese: A cross sectional study. Sleep and Food Registry in Kanagawa (SOREKA). *PLoS One*. 2018;13(1):e0191771. doi:10.1371/journal.pone.0191771
 14. Borel AL, Pepin JL, Nasse L, Baguet JP, Netter S, Benhamou PY. Short sleep duration measured by wrist actimetry is associated with deteriorated glycemic control in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. Oct 2013;36(10):2902-8. doi:10.2337/dc12-2038
 15. Low melatonin secretion is a risk factor for type 2 diabetes. *BMJ*. Apr 10 2013;346:f2202. doi:10.1136/bmj.f2202
 16. Reutrakul S, Sumritsopak R, Saetung S, Chanprasertyothin S, Chailurkit LO, Anothaisintawee T. Lower nocturnal urinary 6-sulfatoxymelatonin is associated with more severe insulin resistance in patients with prediabetes. *Neurobiol Sleep Circadian Rhythms*. Jan 2018;4:10-16. doi:10.1016/j.nbscr.2017.06.001
 17. Zhu H, Zhao ZJ, Liu HY, Cai J, Lu QK, Ji LD, Xu J. The melatonin receptor 1B gene links circadian rhythms and type 2 diabetes mellitus: an evolutionary story. *Ann Med*. Dec 2023;55(1):1262-1286. doi:10.1080/07853890.2023.2191218
 18. Zhang X, Xie L, Zhong M, Yang B, Yang Q, Yang H, Xie C. The association between melatonin receptor 1B gene polymorphisms and type 2 diabetes mellitus (T2DM) in Chinese populations: a meta-analysis. *Ann Palliat Med*. May 2020;9(3):957-966. doi:10.21037/apm-20-691

19. Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep.* May-Jun 2009;61(3):383-410. doi:10.1016/s1734-1140(09)70081-7
20. Doosti-Irani A, Ostadmohammadi V, Mirhosseini N, et al. The Effects of Melatonin Supplementation on Glycemic Control: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Horm Metab Res.* Nov 2018;50(11):783-790. doi:10.1055/a-0752-8462
21. Xia AY, Zhu H, Zhao ZJ, Liu HY, Wang PH, Ji LD, Xu J. Molecular Mechanisms of the Melatonin Receptor Pathway Linking Circadian Rhythm to Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrients.* Mar 15 2023;15(6)doi:10.3390/nu15061406
22. Ashrafizadeh M, Najafi M, Kavyiani N, Mohammadinejad R, Farkhondeh T, Samarghandian S. Anti-Inflammatory Activity of Melatonin: a Focus on the Role of NLRP3 Inflammasome. *Inflammation.* Aug 2021;44(4):1207-1222. doi:10.1007/s10753-021-01428-9
23. Albreiki MS, Middleton B, Hampton SM. The effect of melatonin on glucose tolerance, insulin sensitivity and lipid profiles after a late evening meal in healthy young males. *J Pineal Res.* Dec 2021;71(4):e12770. doi:10.1111/jpi.12770
24. Zhou Z, Sun B, Huang S, Zhu C, Bian M. Glycemic variability: adverse clinical outcomes and how to improve it? *Cardiovasc Diabetol.* Jul 4 2020;19(1):102. doi:10.1186/s12933-020-01085-6
25. Dwan K, Li T, Altman DG, Elbourne D. CONSORT 2010 statement: extension to randomised crossover trials. *BMJ.* Jul 31 2019;366:l4378. doi:10.1136/bmj.l4378
26. Martorina W, Tavares A. Effects of Melatonin on Glycemic Variability in Type 2 Diabetes Mellitus: Protocol for a Crossover, Double-blind, Placebo-controlled Trial. *JMIR Res Protoc.* Jul 5 2023;doi:10.2196/47887
27. Miot HA. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. *J Vasc Bras.* 2011;10:275-278.
28. Medical Jurisprudence: Physicians-Malpractice-Standard of Care and Skill. *Calif Med.* Mar 1948;68(3):188.
29. Gooneratne NS, Edwards AY, Zhou C, Cuellar N, Grandner MA, Barrett JS. Melatonin pharmacokinetics following two different oral surge-sustained release doses in older adults. *J Pineal Res.* May 2012;52(4):437-45. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00958.x
30. Mun JG, Wang D, Doerflein Fulk DL, Fakhary M, Gualco SJ, Grant RW, Mitmesser SH. A Randomized, Double-Blind, Crossover Study to Investigate the Pharmacokinetics of Extended-Release Melatonin Compared to Immediate-Release Melatonin in Healthy Adults. *J Diet Suppl.* May 7 2023:1-13. doi:10.1080/19390211.2023.2206475
31. Harpsoe NG, Andersen LP, Gogenur I, Rosenberg J. Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review. *Eur J Clin Pharmacol.* Aug 2015;71(8):901-9. doi:10.1007/s00228-015-1873-4
32. 8th symposium of the Workshop for Neuropsychopharmacology and Pharmacopsychiatry (AGNP) at Nuremberg, 26-29 October 1977. *Arzneimittelforschung.* 1978;28(8):1253-318.
33. Godoy PH, Nucera A, Colcher AP, de-Andrade JE, Alves D. Screening for obstructive sleep apnea in elderly: performance of the Berlin and STOP-Bang questionnaires and the Epworth Sleepiness Scale using polysomnography as gold standard. *Sleep Sci.* Jan-Mar 2022;15(Spec 1):203-208. doi:10.5935/1984-0063.20220020
34. Cipolla-Neto J, Amaral FGD. Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. *Endocr Rev.* Dec 1 2018;39(6):990-1028. doi:10.1210/er.2018-00084
35. Garaulet M, Lopez-Minguez J, Dashti HS, et al. Interplay of Dinner Timing and MTNR1B Type 2 Diabetes Risk Variant on Glucose Tolerance and Insulin Secretion: A Randomized Crossover Trial. *Diabetes Care.* Mar 1 2022;45(3):512-519. doi:10.2337/dc21-1314

36. Hack LM, Lockley SW, Arendt J, Skene DJ. The effects of low-dose 0.5-mg melatonin on the free-running circadian rhythms of blind subjects. *J Biol Rhythms*. Oct 2003;18(5):420-9. doi:10.1177/0748730403256796
37. Bueno APR, Savi FM, Alves IA, Bandeira VAC. Regulatory aspects and evidences of melatonin use for sleep disorders and insomnia: an integrative review. *Arq Neuropsiquiatr*. Aug 2021;79(8):732-742. doi:10.1590/0004-282X-ANP-2020-0379
38. Garaulet M, Gomez-Abellan P, Rubio-Sastre P, Madrid JA, Saxena R, Scheer FA. Common type 2 diabetes risk variant in MTNR1B worsens the deleterious effect of melatonin on glucose tolerance in humans. *Metabolism*. Dec 2015;64(12):1650-7. doi:10.1016/j.metabol.2015.08.003
39. Morera-Fumero AL, Fernandez-Lopez L, Abreu-Gonzalez P. Melatonin and melatonin agonists as treatments for benzodiazepines and hypnotics withdrawal in patients with primary insomnia. A systematic review. *Drug Alcohol Depend*. Jul 1 2020;212:107994. doi:10.1016/j.drugalcdep.2020.107994
40. Salahub C, Wu PE, Burry LD, Soong C, Sheehan KA, MacMillan TE, Lapointe-Shaw L. Melatonin for Insomnia in Medical Inpatients: A Narrative Review. *J Clin Med*. Dec 29 2022;12(1)doi:10.3390/jcm12010256
41. Choi K, Lee YJ, Park S, Je NK, Suh HS. Efficacy of melatonin for chronic insomnia: Systematic reviews and meta-analyses. *Sleep Med Rev*. Dec 2022;66:101692. doi:10.1016/j.smrv.2022.101692
42. Kunz D, Stotz S, Bes F. Treatment of isolated REM sleep behavior disorder using melatonin as a chronobiotic. *J Pineal Res*. Sep 2021;71(2):e12759. doi:10.1111/jpi.12759
43. Cruz-Sanabria F, Carmassi C, Bruno S, Bazzani A, Carli M, Scarselli M, Faraguna U. Melatonin as a Chronobiotic with Sleep-promoting Properties. *Curr Neuropharmacol*. Feb 17 2022;doi:10.2174/1570159X20666220217152617
44. Tortorolo F, Farren F, Rada G. Is melatonin useful for jet lag? *Medwave*. Dec 21 2015;15 Suppl 3:e6343. doi:10.5867/medwave.2015.6343
45. Srinivasan V, Singh J, Pandi-Perumal SR, Brown GM, Spence DW, Cardinali DP. Jet lag, circadian rhythm sleep disturbances, and depression: the role of melatonin and its analogs. *Adv Ther*. Nov 2010;27(11):796-813. doi:10.1007/s12325-010-0065-y
46. Carriedo-Diez B, Tosoratto-Venturi JL, Canton-Manzano C, Wanden-Berghe C, Sanz-Valero J. The Effects of the Exogenous Melatonin on Shift Work Sleep Disorder in Health Personnel: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. Aug 17 2022;19(16)doi:10.3390/ijerph191610199
47. Caspi O. Melatonin for the prevention and treatment of jet lag. *Altern Ther Health Med*. Mar-Apr 2004;10(2):74-8.

Abbreviations

T2DM: Type 2 diabetes

MTNR1B: melatonina receptor 1B

HbA1C: Glycohemoglobin

D3: Third day of glycemic measurement

Q1: quartile 25%

Q3 quartile 75%

SD: standard deviation

APÊNDICE D- Artigo do protocolo de pesquisa (Publicado: JMIR Research protocols)

TITLE:

Effects of Melatonin on Glycemic Variability in Type 2 *Diabetes mellitus*: Protocol for a Crossover, Double-blind, Placebo-Controlled Trial

AUTHORS:

Wagner José Martorina ^{1,2}; Almir Tavares ^{1,3}

AFFILIATIONS:

1 Neuroscience Program, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

2 Orizonti Institute, Belo Horizonte, MG, Brazil

3 Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Abstract

Background

Glycemic variability has been shown to be a determining factor in the development of micro- and macrovascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). Melatonin, a hormone that regulates various biological rhythms, including those that affect glucose regulation such as hunger, satiety, sleep, and circadian rhythm of hormone secretion (cortisol, growth hormone, catecholamines, and insulin), has been found to be deficient in individuals with T2DM in several studies. That being said, an important question arises: could replacement of melatonin potentially reduce glycemic variability in these patients? This is an intriguing possibility that warrants further investigation, as it may offer a new avenue for improving glycemic control and reducing the risk of complications associated with T2DM.

Hypothesis

Replacing melatonin in individuals with T2DM who are deficient in this hormone may have a positive impact on regulating insulin secretion rhythms and improving insulin sensitivity, ultimately leading to a reduction in glycemic variability.

Design

Crossover, randomized, double-blind, placebo-controlled study.

Methods

In this clinical trial, patients with T2DM in Group 1 will receive melatonin in the first week, undergo a washout period in the second week, and receive a placebo in the third week

(melatonin-washout-placebo). Group 2 will be randomized to receive a sequence of placebo-washout-melatonin. During the last three days of the first and third weeks, capillary blood glucose levels will be measured at six different times, before and after meals. The trial results will be reported in accordance with the CONSORT guidelines for clinical trial reporting.

Expected Results

Thirty T2DM patients will be randomized into two groups: melatonin-washout-placebo or placebo-washout-melatonin. The study aims to compare the mean differences in blood glucose levels between the two groups during the first and third weeks. Additionally, it is expected that there will be a difference in glycemic variability between the days when patients receive the placebo and those when they receive melatonin. After the initial results, the number of patients will be recalculated. If the number of patients is less than or equal to 30, the study will be terminated. If the number of patients exceeds 30, new patients will be recruited to participate in the study.

Conclusion

This study may answer whether melatonin is capable of reducing glycemic variability in patients with T2DM. The crossover model is necessary due to the numerous variables involved (including diet, physical activity, sleep parameters, pharmacological treatments) in the circadian variations of glucose. The low cost of melatonin and its possible role in reducing the serious complications of this disease encouraged this work.

Funding: our own resources

Keywords: Diabetes Mellitus, Type 2; Glycemic Control; Melatonin; Randomized Controlled Trial; Cross-Over Studies

Registry: This study is registered in the Brazilian registry of clinical trials (<https://ensaiosclinicos.gov.br/>) under the number: RBR-6wg54rb

INTRODUCTION

Despite the recent advances in medical technology and treatments for type 2 diabetes mellitus (T2DM), the prevalence of this disease is still increasing exponentially worldwide[101]. According to the International Diabetes Federation, the number of adults with T2DM globally is expected to rise 463 million in 2019 to 700 million by 2045, with significant impact in public health and socio-economic factors[102]. Effective treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM) is crucial in avoiding complications and improving overall health outcomes for patients. In recent years, the management of T2DM has evolved significantly due to the discovery of new therapeutic targets and the development of new drugs with different mechanisms of action.[103] Additionally, non-drug interventions that impact glycemic control have become increasingly important in the management of T2DM[104, 105]. Dietary modification, physical activity, weight management, and stress management have long been recommended. In addition to lifestyle modifications and medication, the role of good quality sleep in managing T2DM has become increasingly recognized by healthcare professionals. The ADA's 2017 position statement underscored the significance of adequate sleep in the management of T2DM and brought attention to the detrimental effect that sleep disturbances can have on glycemic control[106]. Melatonin, a hormone linked to the circadian rhythm, may

be the pathophysiological link between sleep changes and glycemic control[38]. This hormone synchronizes our waking, sleeping, hunger and satiety times, as well as other biological functions such as insulin secretion. Previous studies found that melatonin production is reduced in DMT2[107-109]. While some papers have suggested that melatonin replacement may have benefits for glycemic control, the results of studies have been conflicting, with some studies showing not found significant benefits[110-113]. How could such divergences be explained? The impact of melatonin on glycemic control may depends on several factors, including the timing and duration of use, as well as individual genetic variations, such as the MT2 melatonin receptor polymorphisms[114, 115] Mutations in the MT2 receptor gene have been associated with altered glucose metabolism and insulin sensitivity, and may impact the effectiveness of melatonin supplementation in improving glycemic control. Some studies have suggested that individuals with MT2 receptor mutations may experience an increase in glycohemoglobin levels following melatonin use, unlike those without this mutation.

Assessing the variation of glucose throughout the day, instead of just the average glycohemoglobin levels, is an important aspect of investigating the potential impact of melatonin on glycemic control. In the present work, we will not evaluate the role of melatonin on the average of glucose (glycohemoglobin), but on the variations of glucose throughout the day. Our proposal is to verify whether melatonin influences the circadian rhythm of glucose in patients with T2DM. Currently, no study has evaluated such role of melatonin.

Glycemic variations throughout the day depend on central and peripheral control of insulin secretion and sensitivity. Previous studies have linked the action of melatonin on MT1 and MT2 receptors to insulin secretion and sensitivity[116]. Our hypothesis is that melatonin replacement in melatonin deficient T2DM people may have a positive role in the regulation of

insulin, cortisol, and another secretion rhythms. If this hypothesis is correct, melatonin replacement may reduce the range of blood glucose variation throughout the day. It has already been demonstrated that a wide circadian glucose variation in a patient with diabetes mellitus can be a stress and inflammation factor and determine chronic complications of the disease, as occurs when glycohemoglobin is elevated. [117, 118]. Could melatonin replacement, in these melatonin-deficient patients, attenuate these glycaemic oscillations?

Objective

This research project aims to assess whether melatonin supplementation can reduce glycaemia variations throughout the day in T2DM patients.

MATERIALS AND METHODS

Study design

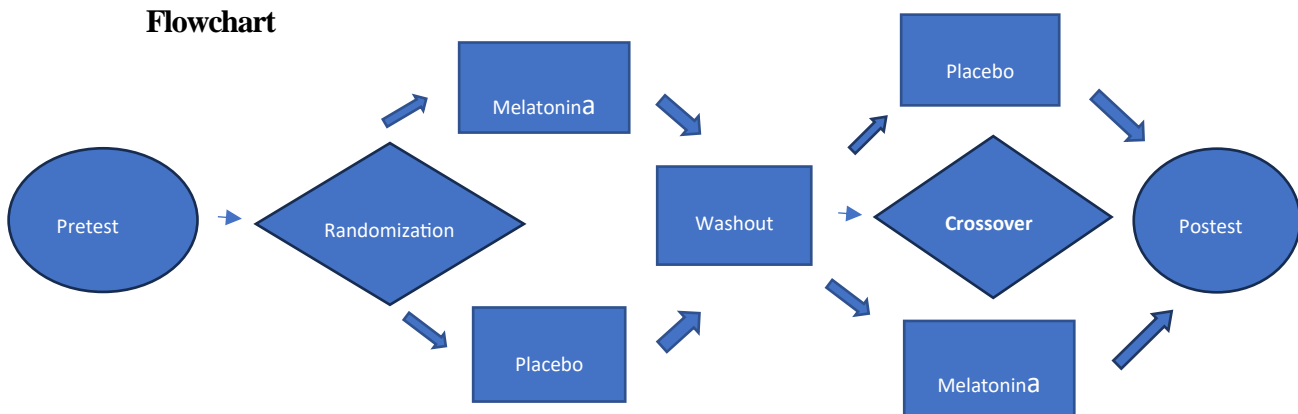
This prospective, crossover, double-blind, randomized, placebo-controlled study was approved by the ethics committee of the Federal University of Minas Gerais. The study will be conducted at an endocrinology outpatient clinic run by the research physician (WM), in the city of Belo Horizonte, Brazil. Thirty patients will participate in the initial phase of this work. These patients will be randomized to 2 groups: the placebo-washout-melatonin group, which will receive placebo for 7 days, followed by 7 days without study medication (washout period), and followed by 7 days of melatonin; or, alternatively, the melatonin-washout-placebo group, which will receive melatonin for 7 days, followed by 7 days without study medication (washout period), and followed by 7 days of placebo. When 15 patients are allocated to one of the possible

intervention orders (placebo followed by melatonin or melatonin followed by placebo), the other 15 patients will be allocated to the intervention order that is not yet complete. Patients will be instructed to use the substance at 21 hours. Patients will receive guidance on diet and physical activity to be followed during these three weeks. On the 5th, 6th and 7th day of the first week, and the 5th, 6th and 7th of the third week, the patients will utilize a glucometer to undertake fasting capillary blood glucose monitoring, before breakfast, 2 hours after breakfast, before lunch, 2 hours after lunch, before dinner, and 2 hours after dinner. The primary outcome analyzed in this study will be the variability of pre- and postprandial glycemia. The result will be compared between two periods: one with placebo and the other with melatonin.

Blinding

Medicine bottles containing melatonin and placebo will be numbered 1 and 2, not necessarily in that order. The individual responsible for assigning the numbers will be the sole person with knowledge of which bottles contains melatonin and which contains placebo. All other people involved in this project (patients, medical researchers, statisticians, and assistant personnel) will be blind in relation to the substances. Upon completion of the statistical analysis, the researchers will be informed as to which vial contained melatonin and which contained placebo.

Flowchart



Glycemic variability and crossover studies

Crossover studies present an advantage over parallel group studies: comparing two or more interventions in the same individual will reduce possible biases related to differences between groups. Such design is suitable for chronic diseases and for testing drugs that control a disease but do not cure it. The cure of the disease in one period of the study would make it meaningless to use another drug or even a placebo in the following period. When studying an outcome that is influenced by several variables, this design allows for a more reliable comparison with a smaller n. This is the case of the assessment of glycemic variability in patients with type 2 diabetes mellitus. Glycemic variability in patients with T2DM can be influenced by several factors. Medications, duration of diabetes, age, diet, physical activity. In the evolution of the treatment of diabetes mellitus, there was a concern in developing drugs that would reduce the oscillation of glycemia: DDPIV inhibitors, GLP1 analogues and ultra-slow insulins. Patients with T2DM are treated with a diverse combination of the available drugs. For this reason, pairing groups for a comparison on glycemic variability would be a complex task. Added to this are individual differences in diet and physical activity. Thus, a crossover study is more suitable for the purpose of this work.

Melatonin and the carry over effect in crossover studies

In crossover studies, an adequate washout period should be proposed. A period in which there is a break from the initial intervention until the beginning of the next intervention. In this work, we proposed a period of one week for the washout. Would that time be adequate? Would have remnants of the initial intervention of the first week in the third week? As melatonin has

a short half-life, we believe that its influence will not be sensed in the third week of the study in the group that uses it initially. A washout period of one week seems sufficient given that the half-life of melatonin is 10 to 60 minutes.[31] Therefore, after a week without using any substance, the initial intervention will not influence the proposed intervention in the third week.

The glyceimic variability

Glyceimic variability refers to fluctuations in blood glucose levels over time. It can be short-term, being evaluated by self-monitoring of capillary blood glucose (pre and postprandial) or by the gold standard method, which is continuous blood glucose monitoring, in which nocturnal blood glucose fluctuations are also recorded every 5 minutes[36, 77]. There is little correlation between the average oscillation of the glyceimic amplitude measured by the continuous glucose monitor and by the self-monitoring of the glyceimia, however, the latter method can be used for structured assessment of the short-term glyceimic variability in a day and between different days. The calculation of glyceimic variability by this method can also be performed using the standard deviation or even the coefficient of variation. A glyceimic variation coefficient of less than 36% is level E of evidence to separate stable from unstable glyceimic control[77]. The measure considered most effective to assess glyceimic variability, however, between different days is the mean difference in glyceimia (MOOD). This measure is obtained by the difference in blood glucose measured at the same time in a 24-hour interval. An additional computer program is used for this measurement, and cannot be obtained only by continuous capillary blood glucose monitoring devices[77]. In this work, we will use pre- and postprandial capillary glyceimia monitoring to obtain the glyceimic variability of patients with T2DM. In addition to the low cost of the method, we believe that this method gives the work an aspect of a real-life study and, therefore, greater clinical relevance.

Inclusion and exclusion criteria

It will be included in this project: (1) patients with DMT2 for more than one year, (2) age greater than or equal to 40 years, (3) family history of DMT2 and (4) glycohemoglobin between 7 and 10%. Item (1) DMT2 for more than one year was established, as the first year of diagnosis may present a patient who has not yet reached his baseline glycemic control. Some patients may have significant improvement in beta-cell glucotoxicity in the first year with reduced blood glucose levels, and therefore have very wide blood glucose variations from one week to the next because of this improvement. In item (2), age was limited, given the fact that most individuals with T2DM are over 40 years old. In this way we avoid including individuals who have an autoimmune or genetic diabetes in the study. Item (3) is important because it further homogenizes our patients. We know that DMT2 has a strong hereditary component, unlike other types of diabetes. In item (4) we limited a glycohemoglobin value range of 7 to 10%. Our objective was to homogenize the glycemic variability among our patients, as it is known that it increases with an increase in glycohemoglobin.

The following will be excluded from this study: (1) pregnant women, (2) patients in recent use of corticosteroids (less than 3 months) or other hyperglycemic medications, (3) patients who have conditions that significantly alter glycemic stability (such as in cases of renal failure, recent acute coronary syndrome and other diseases such as cancer, liver failure, among others). Also excluded will be (4) patients who refuse to participate in this research at some point and (5) those who have uncontrolled diabetes with symptoms of polydipsia, polyuria, weight loss that require other measures such as the use of insulin for glycemic control, in addition to diet, physical activity and medications already in use. It will be excluded from this study (6) patients with high risk criteria for severe sleep apnea, (7) depression and (8) workers

who alternate work shifts. Will be excluded from this study (9) patients who have epilepsy, a condition that can worsen with the use of melatonin.

Most exclusion criteria have the function of limiting conditions that generate very high glycemic variability. It is unlikely that the use of melatonin will be able to reduce the glycemic variability imposed on patients using corticoids, for example. Patients at high risk for sleep apnea, depression, or those who alternate work shifts were excluded due to studies that showed the negative influence of these conditions on glycemic control. Specific studies with these populations seem more adequate for the purpose proposed here.

Ethical aspects

Participants involved in this study will be required to sign an informed consent form that has been drafted in compliance with the Declaration of Helsinki[119]. The term in question was initially sanctioned, together with the entire project outlined herein, by the ethics committee of the Federal University of Minas Gerais. The invitation to partake in this study shall be extended during a routine consultation at the endocrinology physician's (WM) office. Participants, if they meet the inclusion criteria, will volunteer their participation. There will be no payment. All research objectives, as well as the potential risks pertaining the use of melatonin, shall be explicated. We emphasize, however, that melatonin is a low-risk substance with few side-effects. A possible risk would be daytime drowsiness, but this is unlikely given the very short half-life of the drug and the low dose utilized.

Randomization

Patients will be randomized into two groups. Group 1 will use the substance contained in bottle 1 in the first week, will not use substances in the second week (washout period) and in the third week will use the substance contained in bottle 2. Group 2 will use the substance contained in bottle 2 in the first week, will not use substances in the second week (washout period) and, in the third week, will use the substance contained in vial 1.

Patients will be divided into these groups according to the result of rolling a dice. Those who roll a number from 1 to 3 will be in group 1 e. those who draw the numbers from 4 to 6 will be in group 2. When a group completes 15 participants, the other patients will be automatically allocated to the group that is not complete until the other 15 participants complete. The project researcher will know which patients will use vial 1 or 2 in the first and third weeks, but will not know which vial contains placebo and which contains melatonin.

Interventions

Patients will use melatonin in the first week and placebo in the third week or placebo in the first week and melatonin in the third week, according to the randomization described. On days 5, 6 and 7 of the first and third weeks of the study, patients will have fasting capillary blood glucose levels, 2 hours after breakfast, before lunch, 2 hours after lunch, before dinner and 2 hours after dinner. Patients will also receive guidance on diet and physical activity to be followed during these three weeks. In the second week, patients will undergo a washout period. At the end of the study, the patients returned to the office with their capillary blood glucose results. At this point, they will be asked about excessive daytime sleepiness at some point in the study and whether they suspected at any time which would be the placebo substance or melatonin.

Procedures

Patients with DMT2 will be selected to take part in this study during a routine consultation held in an outpatient endocrinology clinic. At the end of a usual consultation, the endocrinologist, when verifying that the patient meets the inclusion criteria, will ask the patient if he is interested in participating in research on diabetes and melatonin. This question will be followed by reading the informed consent form. All stages of the research will be explained to the patient. This includes the research period, the use of placebo substance and melatonin, the need to perform capillary blood glucose 6 times a day for 3 days in the first week, and 3 days in the third week, the washout period, and the delivery of capillary blood glucose results after the 3 weeks of the project. If the patient agrees to participate in the project, the researcher will ask him to sign the free and informed consent form. A copy of this form will be given to the patient. Next, the researcher will ask the patient to throw a dice. Patients who roll a number from 1 to 3 will be in group 1 and will be included in the following sequence: vial 1 - washout - vial 2. Those who roll a number from 4 to 6 will be included in the sequence vial 2 – washout – vial 1. After allocating the patient to one of the intervention precepts, the project researcher will fill in the research record, which will contain the epidemiological, clinical, and laboratory data of the patients: age, gender, duration of diabetes, history of epilepsy, insulin use (or not), STOP bang questionnaire, weight, height, BMI, abdominal circumference and glycohemoglobin value. After this step, the patient will be guided on the diet and physical activity regimens to be carried out during the three weeks of the project. Patients will be instructed to perform 30 minutes of physical activity 5 times a week during the three weeks of the project. After these guidences, patients will receive to take home: a glucometer, strips for measuring capillary blood glucose, and lancets. In addition, patients will be given a table to

record capillary blood glucose values. At the end of the third week, the patient will return with the blood glucose values found.

Primary and secondary outcomes

The primary endpoint of this study will be the difference in mean variability of patients' blood glucose levels, between the first and third week of the study. The data shall be acquired through computing the average of the variance between the total blood glucose levels obtained in these weeks.

As a secondary outcome, we shall evaluate the mean disparities in glycemia at each time interval, namely fasting, 2 hours after fasting/before lunch, 2 hours post-lunch, before dinner and 2 hours post-dinner. This assessment aims to determine whether the use of melatonin has any discernable impact on blood glucose fluctuation at specific times of the day.

In order to analyze the effect of melatonin after a greater number of days of use, we will perform a specific analysis of the glycemetic variability obtained on the last day of glycemetic measurement in the first and third weeks.

We will also do a categorical analysis that will take into account the coefficient of variation of blood glucose levels during the use of placebo and during the use of melatonin. We will consider stable when this value is less than 36% and not stable when higher than this value. We will evaluate whether in the week in which melatonin was used, the variability was compatible with a value considered stable ($< 36\%$) according to this coefficient.

Sample size

The sample size will comprise thirty patients. As referenced in the literature, when we do not know the standard deviation and population frequencies of a given variable, a pre-test should be performed with 30 to 40 patients and consider the behavior of this group as a population estimate[71]. After collecting blood glucose data for the first and third weeks, the mean of the glycemic variability and the standard deviation will be calculated so that the n can be reestablished. This is necessary, as there are no similar studies in the literature. If n is less than 30 patients, the study will be concluded, and if it is greater than this number, new patients will be included, up to the established n.

Statistical analysis

If quantitative variables adhere to a normal distribution represented by the Gaussian curve, their central tendency will be expressed as mean and their dispersion will be quantified by the standard deviation. If the distribution of these variables does not follow a normal distribution, then their central tendency will be described by the median and their dispersion will be characterized by the 25% and 75% quartiles. The the Shapiro-Wilk will be utilized to assess normality. Categorical variables will be presented using both absolute frequency and percentage.

Statistical analyses for normal quantitative variables, both before and after the intervention, will be conducted using the paired t-test. When the distribution is not normal, the Wilcoxon test will be employed.

The patients will be compared with one another based on the capillary blood glucose results obtained during the first and third weeks.

The epidemiological, clinical and laboratory data of the patients will be compared between groups 1 and 2, in order to evaluate whether the randomization process has generated groups that lack statistical differences that may influence the research results.

The significance level to be employed will be 0.05, whilst the software of choice will be SPSS version 20.0.

RESULTS

This pilot project will initially involve 30 participants. Upon selection of these patients and completion of the three-week research period, a statistical analysis shall be conducted on the variability of capillary blood glucose during the first and third weeks. Subsequently, this data will be utilized to determine the required sample size (N) necessary to draw valid conclusions regarding the proposed research objectives. If N is equal or less than 30, the study shall conclude. Furthermore, in addition to the capillary blood glucose values, the presented data in Table 1 will be scrutinized to ensure the absence of statistical discrepancies between groups 1 and 2.

TABLE 1.**Epidemiological, clinical, and laboratory data**

Number of participants	30
Age	Mid ou median
Sex (female)	N (%)
Use of insulin	N (%)
IMC	Mid ou median
Abdominal circumference	Mid or median
Duration of diabetes	Mid or median
STOP Bang	Mid or median
Glycohemoglobin	Mid or median

TABLE 2.**Results**

Unpaired sample t- test	placebo	intervention	p (IC 95%)
Sum of the differences between all pre- and post-prandial blood glucose levels			
Sum of the difference between pre- and post-prandial blood glucose levels – breakfast glucose levels			
Sum of the difference between pre- and post-prandial blood glucose levels - lunch glucose levels			
Sum of the difference between pre- and post-prandial blood			

glucose levels - dinner glucose levels			
Sum of the difference between all pre- and postprandial blood glucose levels on the last day of blood glucose measurement			

DISCUSSION

The role of melatonin in the glycemic control of T2DM patients has been studied for a number of years.[26] However, studies on the role of melatonin in glycemic variability, however, are not available. Our work does not aim to assess the impact of melatonin on glycohemoglobin levels, but rather its effect on glycemic variability. The hypothesis was tested based on the fact that melatonin, as a hormone, plays a crucial role in regulating circadian rhythms. This notion appears to be more logical to us, given that a hormone whose secretion is primarily nocturnal, such as melatonin, governs numerous biological rhythms[120]. If demonstrated, this fact could signify a great advance in the management of T2DM, as it would provide a new therapeutic target: the deficiency of melatonin production in affected individuals. The primary aim of this work is present a new approach toward managing and preventing chronic complications in patients diagnosed with T2DM.

Limitations

The limitation inherent in this study pertains to the analysis of glycemic variability conducted over a short span of a few days after melatonin or placebo. The effectiveness of melatonin in reducing glycemic variability might occur with longer use.

A second limitation of this study is derived from the fact that endogenous melatonin peaks in the middle of the night. The exogenous melatonin administered to patients in this work will not reproduce the physiological endogenous melatonin rhythm.

A third limitation is the fact that patients may engage in diet and physical activity fluctuations between weeks 1 and 3 of the study, despite the guidance given initially, which might interfere with glycemic variability.

Conclusions

The study of glycemic variability in patients with T2DM is fundamental for the prevention of chronic complications of the disease. Melatonin is a substance involved in biological rhythms, including those related to glucose control, such as insulin secretion. Previous knowledge that patients with T2DM produce a smaller amount of melatonin motivated her to test the replacement of this hormone as an instrument for greater glycemic stability. As glycemic variability is influenced by several variables, we conclude that this study, in the crossover model, is more adequate than the paired group model to evaluate the role of melatonin in glycemic stability.

Acknowledgements

no

REFERENCES

1. ElSayed, N.A., et al., 3. *Prevention or Delay of Type 2 Diabetes and Associated Comorbidities: Standards of Care in Diabetes-2023*. Diabetes Care, 2023. **46**(Suppl 1): p. S41-S48.
2. Clarke, S.F. and J.R. Foster, *A history of blood glucose meters and their role in self-monitoring of diabetes mellitus*. Br J Biomed Sci, 2012. **69**(2): p. 83-93.
3. ElSayed, N.A., et al., 6. *Glycemic Targets: Standards of Care in Diabetes-2023*. Diabetes Care, 2023. **46**(Suppl 1): p. S97-S110.
4. Gray, A., et al., *Cost effectiveness of an intensive blood glucose control policy in patients with type 2 diabetes: economic analysis alongside randomised controlled trial (UKPDS 41)*. United Kingdom Prospective Diabetes Study Group. BMJ, 2000. **320**(7246): p. 1373-8.
5. Levin, S.R., et al., *Effect of intensive glycemic control on microalbuminuria in type 2 diabetes. Veterans Affairs Cooperative Study on Glycemic Control and Complications in Type 2 Diabetes Feasibility Trial Investigators*. Diabetes Care, 2000. **23**(10): p. 1478-85.

6. Committee, A.M., *Study rationale and design of ADVANCE: action in diabetes and vascular disease--preterax and diamicron MR controlled evaluation*. *Diabetologia*, 2001. **44**(9): p. 1118-20.
7. O'Connor, P.J. and F. Ismail-Beigi, *Near-Normalization of Glucose and Microvascular Diabetes Complications: Data from ACCORD and ADVANCE*. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2011. **2**(1): p. 17-26.
8. Lorenzo-Medina, M., et al., *Pitfalls of glycated hemoglobin in the glycemic assessment of diabetes patients with hemoglobin lousville: role of serum fructosamine*. *J Diabetes Sci Technol*, 2013. **7**(3): p. 804-5.
9. Chatziralli, I.P., *The Role of Glycemic Control and Variability in Diabetic Retinopathy*. *Diabetes Ther*, 2018. **9**(1): p. 431-434.
10. Firouzabadi, M.D., et al., *Glycemic profile variability: An independent risk factor for diabetic neuropathy in patients with type 2 diabetes*. *Prim Care Diabetes*, 2023. **17**(1): p. 38-42.
11. Monnier, L., et al., *Toward Defining the Threshold Between Low and High Glucose Variability in Diabetes*. *Diabetes Care*, 2017. **40**(7): p. 832-838.
12. Luo, M., et al., *Effect of Dapagliflozin on Glycemic Variability in Patients with Type 2 Diabetes under Insulin Glargine Combined with Other Oral Hypoglycemic Drugs*. *J Diabetes Res*, 2020. **2020**: p. 6666403.
13. Chai, S., et al., *Influence of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on glycemic variability in patients with type 2 diabetes: A meta-analysis of randomized controlled trials*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022. **13**: p. 935039.
14. Elhabashy, S.A., E.M. Sakr, and N.Y. Salah, *The efficacy of insulin degludec and insulin glargine over NPH insulin among toddlers and preschoolers with type 1 diabetes using glycemic variability and time in range*. *Eur J Pediatr*, 2023.
15. Zhu, X., et al., *The Effect of Physical Activity on Glycemic Variability in Patients With Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021. **12**: p. 767152.
16. Bennetsen, S.L., et al., *The Impact of Physical Activity on Glycemic Variability Assessed by Continuous Glucose Monitoring in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020. **11**: p. 486.
17. Reutrakul, S., et al., *Chronotype is independently associated with glycemic control in type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 2013. **36**(9): p. 2523-9.
18. DeVries, J.H., *Glucose variability: where it is important and how to measure it*. *Diabetes*, 2013. **62**(5): p. 1405-8.
19. *Low melatonin secretion is a risk factor for type 2 diabetes*. *BMJ*, 2013. **346**: p. f2202.
20. Reutrakul, S., et al., *Lower nocturnal urinary 6-sulfatoxymelatonin is associated with more severe insulin resistance in patients with prediabetes*. *Neurobiol Sleep Circadian Rhythms*, 2018. **4**: p. 10-16.
21. Zhu, H., et al., *The melatonin receptor 1B gene links circadian rhythms and type 2 diabetes mellitus: an evolutionary story*. *Ann Med*, 2023. **55**(1): p. 1262-1286.
22. Zhang, X., et al., *The association between melatonin receptor 1B gene polymorphisms and type 2 diabetes mellitus (T2DM) in Chinese populations: a meta-analysis*. *Ann Palliat Med*, 2020. **9**(3): p. 957-966.
23. Garaulet, M., et al., *Interplay of Dinner Timing and MTNR1B Type 2 Diabetes Risk Variant on Glucose Tolerance and Insulin Secretion: A Randomized Crossover Trial*. *Diabetes Care*, 2022. **45**(3): p. 512-519.
24. Garaulet, M., et al., *Common type 2 diabetes risk variant in MTNR1B worsens the deleterious effect of melatonin on glucose tolerance in humans*. *Metabolism*, 2015. **64**(12): p. 1650-7.

25. Osonoi, Y., et al., *Morningness-eveningness questionnaire score and metabolic parameters in patients with type 2 diabetes mellitus*. Chronobiol Int, 2014. **31**(9): p. 1017-23.
26. Doosti-Irani, A., et al., *The Effects of Melatonin Supplementation on Glycemic Control: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials*. Horm Metab Res, 2018. **50**(11): p. 783-790.
27. Garfinkel, D., et al., *Efficacy and safety of prolonged-release melatonin in insomnia patients with diabetes: a randomized, double-blind, crossover study*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2011. **4**: p. 307-13.
28. Ramirez, A.V.G., D.R. Filho, and L. de Sa, *Melatonin and its Relationships with Diabetes and Obesity: A Literature Review*. Curr Diabetes Rev, 2021. **17**(7): p. e072620184137.
29. Patel, R., et al., *Diabetes mellitus and melatonin: Where are we?* Biochimie, 2022. **202**: p. 2-14.
30. American Diabetes, A., *Standards of Medical Care in Diabetes-2017 Abridged for Primary Care Providers*. Clin Diabetes, 2017. **35**(1): p. 5-26.
31. Zawilska, J.B., D.J. Skene, and J. Arendt, *Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(3): p. 383-410.
32. DeFronzo, R.A., et al., *Type 2 diabetes mellitus*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15019.
33. Xia, A.Y., et al., *Molecular Mechanisms of the Melatonin Receptor Pathway Linking Circadian Rhythm to Type 2 Diabetes Mellitus*. Nutrients, 2023. **15**(6).
34. Pandi-Perumal, S.R., et al., *Melatonin: Nature's most versatile biological signal?* FEBS J, 2006. **273**(13): p. 2813-38.
35. Minich, D.M., et al., *Is Melatonin the "Next Vitamin D"?: A Review of Emerging Science, Clinical Uses, Safety, and Dietary Supplements*. Nutrients, 2022. **14**(19).
36. Zhou, Z., et al., *Glycemic variability: adverse clinical outcomes and how to improve it?* Cardiovasc Diabetol, 2020. **19**(1): p. 102.
37. Reiter, R.J., D.X. Tan, and L. Fuentes-Broto, *Melatonin: a multitasking molecule*. Prog Brain Res, 2010. **181**: p. 127-51.
38. Cipolla-Neto, J. and F.G.D. Amaral, *Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights*. Endocr Rev, 2018. **39**(6): p. 990-1028.
39. Vasey, C., J. McBride, and K. Penta, *Circadian Rhythm Dysregulation and Restoration: The Role of Melatonin*. Nutrients, 2021. **13**(10).
40. Claustrat, B. and J. Leston, *Melatonin: Physiological effects in humans*. Neurochirurgie, 2015. **61**(2-3): p. 77-84.
41. Quay, W.B., et al., *Melatonin's inhibition of pituitary, adrenal, testicular and accessory gland growth in male golden hamsters: pineal dependence and organ differences with shielding and intracranial surgery*. J Neural Transm, 1982. **53**(1): p. 59-73.
42. Li, H., et al., *Melatonin Modulates Lactation by Regulating Prolactin Secretion Via Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons in the Hypothalamus- Pituitary System*. Curr Protein Pept Sci, 2020. **21**(8): p. 744-750.
43. Tsukamoto-Yamauchi, N., T. Terasaka, Y. Iwasaki, and F. Otsuka, *Interaction of pituitary hormones and expression of clock genes modulated by bone morphogenetic protein-4 and melatonin*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **459**(1): p. 172-7.
44. Albreiki, M.S., B. Middleton, and S.M. Hampton, *The effect of melatonin on glucose tolerance, insulin sensitivity and lipid profiles after a late evening meal in healthy young males*. J Pineal Res, 2021. **71**(4): p. e12770.
45. Lauritzen, E.S., U. Kampmann, S.B. Smedegaard, and J. Stoy, *Effects of daily administration of melatonin before bedtime on fasting insulin, glucose and insulin sensitivity in healthy adults and patients with metabolic diseases. A systematic review and meta-analysis*. Clin Endocrinol (Oxf), 2021. **95**(5): p. 691-701.

46. Owino, S., et al., *Nocturnal activation of melatonin receptor type 1 signaling modulates diurnal insulin sensitivity via regulation of PI3K activity*. J Pineal Res, 2018. **64**(3).
47. Yoo, Y.M., *Melatonin-mediated insulin synthesis during endoplasmic reticulum stress involves HuD expression in rat insulinoma INS-1E cells*. J Pineal Res, 2013. **55**(2): p. 207-20.
48. Karamitri, A., et al., *Type 2 diabetes-associated variants of the MT(2) melatonin receptor affect distinct modes of signaling*. Sci Signal, 2018. **11**(545).
49. Marzougui, H., et al., *Melatonin intake before intradialytic exercise reverses oxidative stress and improves antioxidant status in hemodialysis patients*. Int J Artif Organs, 2023. **46**(5): p. 264-273.
50. Navarro-Alarcon, M., et al., *Melatonin and metabolic regulation: a review*. Food Funct, 2014. **5**(11): p. 2806-32.
51. Rodriguez-Santana, C., et al., *Role of Melatonin in Cancer: Effect on Clock Genes*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(3).
52. Sharma, S., et al., *The role of melatonin in diabetes: therapeutic implications*. Arch Endocrinol Metab, 2015. **59**(5): p. 391-9.
53. Cipolla-Neto, J., et al., *Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review*. J Pineal Res, 2014. **56**(4): p. 371-81.
54. Blancas-Velazquez, A.S., T. Bering, S. Bille, and M.F. Rath, *Role and neural regulation of clock genes in the rat pineal gland: Clock modulates amplitude of rhythmic expression of Aanat encoding the melatonin-producing enzyme*. J Pineal Res, 2023.
55. Reppert, S.M. and D.R. Weaver, *Molecular analysis of mammalian circadian rhythms*. Annu Rev Physiol, 2001. **63**: p. 647-76.
56. Touitou, Y., A. Reinberg, and D. Touitou, *Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption*. Life Sci, 2017. **173**: p. 94-106.
57. Stevens, R.G. and Y. Zhu, *Electric light, particularly at night, disrupts human circadian rhythmicity: is that a problem?* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2015. **370**(1667).
58. Gooneratne, N.S., et al., *Melatonin pharmacokinetics following two different oral surge-sustained release doses in older adults*. J Pineal Res, 2012. **52**(4): p. 437-45.
59. Mun, J.G., et al., *A Randomized, Double-Blind, Crossover Study to Investigate the Pharmacokinetics of Extended-Release Melatonin Compared to Immediate-Release Melatonin in Healthy Adults*. J Diet Suppl, 2023: p. 1-13.
60. Harpsoe, N.G., L.P. Andersen, I. Gogenur, and J. Rosenberg, *Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review*. Eur J Clin Pharmacol, 2015. **71**(8): p. 901-9.
61. Morera-Fumero, A.L., L. Fernandez-Lopez, and P. Abreu-Gonzalez, *Melatonin and melatonin agonists as treatments for benzodiazepines and hypnotics withdrawal in patients with primary insomnia. A systematic review*. Drug Alcohol Depend, 2020. **212**: p. 107994.
62. Salahub, C., et al., *Melatonin for Insomnia in Medical Inpatients: A Narrative Review*. J Clin Med, 2022. **12**(1).
63. Choi, K., et al., *Efficacy of melatonin for chronic insomnia: Systematic reviews and meta-analyses*. Sleep Med Rev, 2022. **66**: p. 101692.
64. Kunz, D., S. Stotz, and F. Bes, *Treatment of isolated REM sleep behavior disorder using melatonin as a chronobiotic*. J Pineal Res, 2021. **71**(2): p. e12759.
65. Cruz-Sanabria, F., et al., *Melatonin as a Chronobiotic with Sleep-promoting Properties*. Curr Neuropharmacol, 2022.
66. Tortorolo, F., F. Farren, and G. Rada, *Is melatonin useful for jet lag?* Medwave, 2015. **15 Suppl 3**: p. e6343.

67. Srinivasan, V., et al., *Jet lag, circadian rhythm sleep disturbances, and depression: the role of melatonin and its analogs*. *Adv Ther*, 2010. **27**(11): p. 796-813.
68. Carriedo-Diez, B., et al., *The Effects of the Exogenous Melatonin on Shift Work Sleep Disorder in Health Personnel: A Systematic Review*. *Int J Environ Res Public Health*, 2022. **19**(16).
69. Caspi, O., *Melatonin for the prevention and treatment of jet lag*. *Altern Ther Health Med*, 2004. **10**(2): p. 74-8.
70. Dwan, K., T. Li, D.G. Altman, and D. Elbourne, *CONSORT 2010 statement: extension to randomised crossover trials*. *BMJ*, 2019. **366**: p. l4378.
71. Miot, H.A., *Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais*. *J Vasc Bras.*, 2011. **10**: p. 275-278.
72. Kusunoki, Y., K. Konishi, T. Tsunoda, and H. Koyama, *Significance of Glycemic Variability in Diabetes Mellitus*. *Intern Med*, 2022. **61**(3): p. 281-290.
73. Zhang, L., et al., *Glycaemic variability and risk of adverse cardiovascular events in acute coronary syndrome*. *Diab Vasc Dis Res*, 2022. **19**(6): p. 14791641221137736.
74. Dhatariya, K., et al., *The Association Between Mean Glycated Haemoglobin or Glycaemic Variability and the Development of Retinopathy in People with Diabetes: A Retrospective Observational Cohort Study*. *Diabetes Ther*, 2021. **12**(10): p. 2755-2766.
75. Jin, S.M., et al., *Association between the extent of urinary albumin excretion and glycaemic variability indices measured by continuous glucose monitoring*. *Diabet Med*, 2015. **32**(2): p. 274-9.
76. Monnier, L., et al., *Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes*. *JAMA*, 2006. **295**(14): p. 1681-7.
77. Ceriello, A., L. Monnier, and D. Owens, *Glycaemic variability in diabetes: clinical and therapeutic implications*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2019. **7**(3): p. 221-230.
78. Clodi, M., et al., *[Antihyperglycemic treatment guidelines for diabetes mellitus type 2 (Update 2023)]*. *Wien Klin Wochenschr*, 2023. **135**(Suppl 1): p. 32-44.
79. Godoy, P.H., et al., *Screening for obstructive sleep apnea in elderly: performance of the Berlin and STOP-Bang questionnaires and the Epworth Sleepiness Scale using polysomnography as gold standard*. *Sleep Sci*, 2022. **15**(Spec 1): p. 203-208.
80. Abrishami, A., A. Khajehdehi, and F. Chung, *A systematic review of screening questionnaires for obstructive sleep apnea*. *Can J Anaesth*, 2010. **57**(5): p. 423-38.
81. Pataka, A., et al., *Evaluation of five different questionnaires for assessing sleep apnea syndrome in a sleep clinic*. *Sleep Med*, 2014. **15**(7): p. 776-81.
82. Chung, F., et al., *STOP questionnaire: a tool to screen patients for obstructive sleep apnea*. *Anesthesiology*, 2008. **108**(5): p. 812-21.
83. Boynton, G., et al., *Validation of the STOP-BANG Questionnaire among Patients Referred for Suspected Obstructive Sleep Apnea*. *J Sleep Disord Treat Care*, 2013. **2**(4).
84. Duarte, R.L.M., et al., *Validation of the STOP-Bang questionnaire as a means of screening for obstructive sleep apnea in adults in Brazil*. *J Bras Pneumol*, 2017. **43**(6): p. 456-463.
85. Hack, L.M., S.W. Lockley, J. Arendt, and D.J. Skene, *The effects of low-dose 0.5-mg melatonin on the free-running circadian rhythms of blind subjects*. *J Biol Rhythms*, 2003. **18**(5): p. 420-9.
86. Bueno, A.P.R., F.M. Savi, I.A. Alves, and V.A.C. Bandeira, *Regulatory aspects and evidences of melatonin use for sleep disorders and insomnia: an integrative review*. *Arq Neuropsiquiatr*, 2021. **79**(8): p. 732-742.
87. Kahal, H., et al., *Effect of induced hypoglycemia on inflammation and oxidative stress in type 2 diabetes and control subjects*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 4750.

88. Battelino, T. and K. Dovc, *Glycemic Variability: The Danger of a Physiologically Stable Metric*. J Clin Endocrinol Metab, 2020. **105**(10): p. e3815-7.
89. Cheng, D., et al., *HbA1C variability and the risk of renal status progression in Diabetes Mellitus: a meta-analysis*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e115509.
90. Cappuccio, F.P., L. D'Elia, P. Strazzullo, and M.A. Miller, *Quantity and quality of sleep and incidence of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis*. Diabetes Care, 2010. **33**(2): p. 414-20.
91. Hein, M., et al., *Prevalence and risk factors of type 2 diabetes in insomnia sufferers: a study on 1311 individuals referred for sleep examinations*. Sleep Med, 2018. **46**: p. 37-45.
92. Botros, N., et al., *Obstructive sleep apnea as a risk factor for type 2 diabetes*. Am J Med, 2009. **122**(12): p. 1122-7.
93. Pamidi, S., R.S. Aronsohn, and E. Tasali, *Obstructive sleep apnea: role in the risk and severity of diabetes*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2010. **24**(5): p. 703-15.
94. Martorina, W. and A. Tavares, *Real-World Data in Support of Short Sleep Duration with Poor Glycemic Control, in People with Type 2 Diabetes Mellitus*. J Diabetes Res, 2019. **2019**: p. 6297162.
95. Sakamoto, R., et al., *Association of usual sleep quality and glycemic control in type 2 diabetes in Japanese: A cross sectional study. Sleep and Food Registry in Kanagawa (SOREKA)*. PLoS One, 2018. **13**(1): p. e0191771.
96. Borel, A.L., et al., *Short sleep duration measured by wrist actimetry is associated with deteriorated glycemic control in type 1 diabetes*. Diabetes Care, 2013. **36**(10): p. 2902-8.
97. Ashrafzadeh, M., et al., *Anti-Inflammatory Activity of Melatonin: a Focus on the Role of NLRP3 Inflammasome*. Inflammation, 2021. **44**(4): p. 1207-1222.
98. Martorina, W. and A. Tavares, *Effects of Melatonin on Glycemic Variability in Type 2 Diabetes Mellitus: Protocol for a Crossover, Double-blind, Placebo-controlled Trial*. JMIR Res Protoc, 2023.
99. *Medical Jurisprudence: Physicians-Malpractice-Standard of Care and Skill*. Calif Med, 1948. **68**(3): p. 188.
100. *8th symposium of the Workshop for Neuropsychopharmacology and Pharmacopsychiatry (AGNP) at Nuremberg, 26-29 October 1977*. Arzneimittelforschung, 1978. **28**(8): p. 1253-318.
101. Lovic, D., et al., *The Growing Epidemic of Diabetes Mellitus*. Curr Vasc Pharmacol, 2020. **18**(2): p. 104-109.
102. Seuring, T., O. Archangelidi, and M. Suhrcke, *The Economic Costs of Type 2 Diabetes: A Global Systematic Review*. Pharmacoeconomics, 2015. **33**(8): p. 811-31.
103. Zimmet, P., K.G. Alberti, D.J. Magliano, and P.H. Bennett, *Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies*. Nat Rev Endocrinol, 2016. **12**(10): p. 616-22.
104. Nauck, M.A., J. Wefers, and J.J. Meier, *Treatment of type 2 diabetes: challenges, hopes, and anticipated successes*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2021. **9**(8): p. 525-544.
105. Taylor, S.I., Z.S. Yazdi, and A.L. Beitelshes, *Pharmacological treatment of hyperglycemia in type 2 diabetes*. J Clin Invest, 2021. **131**(2).
106. American Diabetes, A., *3. Comprehensive Medical Evaluation and Assessment of Comorbidities*. Diabetes Care, 2017. **40**(Suppl 1): p. S25-S32.
107. Patel, R., et al., *Diabetes mellitus and melatonin: Where are we?* Biochimie, 2022.
108. Tanaka, K., et al., *Associations between urinary 6-sulfatoxymelatonin excretion and diabetic vascular complications or arteriosclerosis in patients with type 2 diabetes*. J Diabetes Investig, 2021. **12**(4): p. 601-609.
109. McMullan, C.J., E.S. Schernhammer, and J.P. Forman, *Melatonin level and risk for type 2 diabetes--in reply*. JAMA, 2013. **310**(5): p. 537.

110. Lauritzen, E.S., et al., *Three months of melatonin treatment reduces insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes-A randomized placebo-controlled crossover trial*. J Pineal Res, 2022. **73**(1): p. e12809.
111. McMullan, C.J., et al., *Melatonin secretion and the incidence of type 2 diabetes*. JAMA, 2013. **309**(13): p. 1388-96.
112. Rahman, M.M., et al., *Melatonin supplementation plus exercise behavior ameliorate insulin resistance, hypertension and fatigue in a rat model of type 2 diabetes mellitus*. Biomed Pharmacother, 2017. **92**: p. 606-614.
113. Tresguerres, J.A., et al., *Beneficial effect of melatonin treatment on age-related insulin resistance and on the development of type 2 diabetes*. Horm Mol Biol Clin Investig, 2013. **16**(2): p. 47-54.
114. Patel, R., et al., *Association of melatonin & MTNR1B variants with type 2 diabetes in Gujarat population*. Biomed Pharmacother, 2018. **103**: p. 429-434.
115. Xia, Q., et al., *Association between the melatonin receptor 1B gene polymorphism on the risk of type 2 diabetes, impaired glucose regulation: a meta-analysis*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50107.
116. Zhou, J., et al., *Neu-P11, a novel MT1/MT2 agonist, reverses diabetes by suppressing the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats*. Eur J Pharmacol, 2017. **812**: p. 225-233.
117. Valente, T. and A.K. Arbex, *Glycemic Variability, Oxidative Stress, and Impact on Complications Related to Type 2 Diabetes Mellitus*. Curr Diabetes Rev, 2021. **17**(7): p. e071620183816.
118. Lachin, J.M., et al., *Association of Glycemic Variability in Type 1 Diabetes With Progression of Microvascular Outcomes in the Diabetes Control and Complications Trial*. Diabetes Care, 2017. **40**(6): p. 777-783.
119. Merz, J.F., *The Nuremberg Code and Informed Consent for Research*. JAMA, 2018. **319**(1): p. 85-86.
120. Cajochen, C., K. Krauchi, and A. Wirz-Justice, *Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep*. J Neuroendocrinol, 2003. **15**(4): p. 432-7.