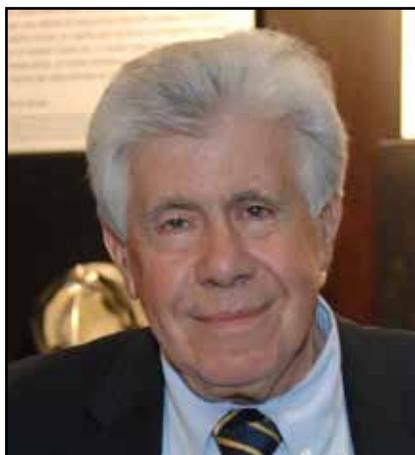


Daniel Cardinali

por Diego Golombek



Uno nunca sabe que tiene un maestro... hasta muchos años más tarde. Pero todo llega, y al analizar decisiones, formas de encarar la ciencia, éticas o divergencias, de pronto uno se ve reflejado en la imagen de los que lo formaron, lo guiaron y le hicieron ver al mundo con otros ojos.

Eso es para mí, y me atrevo a decir que también para muchos otros de sus discípulos, Daniel Cardinali. Lo conocí de lejos en un congreso, cuando buscaba alguna señal que pudiera relacionar con mi interés por “el tiempo del lado de adentro”, allá en mis primeros años de la universidad. Confieso: en ese momento no entendí demasiado de qué se trataban esas historias de la noche, de las hormonas, de los receptores... pero allí estaba *el tiempo*, sin duda, y terminó de atraparme. Claro, no era para menos: al poco rato me enteré de que Daniel era “la” eminencia en el tema, que venía persiguiendo a la pineal desde hacía años – literalmente, como cuando durante su doctorado perseguía patos a los que les tapaba la cabeza para impedir la llegada de la luz – y que era considerado el experto mundial en la melatonina y sus circunstancias (entre las que afortunadamente se encontraban los relojes y calendarios biológicos). La pineal, nada menos: la sede cartesiana del alma, el tercer ojo, el *ajna-chakram*,

el órgano perdido dentro del cerebro al que costaba encontrarle una función. Porque ¿qué hace un órgano impar, calcificado, extraño, allí en medio del sistema nervioso central? El descubrimiento de su rol en la reproducción, en la sincronización interna y, más cercanamente en la salud y la calidad de vida ha sido una verdadera aventura de la ciencia y del pensamiento, y allí estuvo Daniel como primer aventurero, como un Indiana Jones en la vanguardia de los que develan los secretos de la naturaleza. Su tarea de detective fisiológico no dejó aspecto por investigar: el transporte de la melatonina, sus receptores, su metabolismo. Pero también, no olvidando su formación como médico, su potencial (y real) uso clínico, tanto como ajustador de las agujas del reloj biológico (cronobiótico) como su rol en la regulación del ciclo de sueño y vigilia o, de manera más general, el aprovechamiento de su potente actividad antioxidante en una

gran variedad de aplicaciones.

Así, las bases estaban más que sentadas para que un joven cronobiólogo pudiera despacharse a gusto buscando el tiempo interno, con una libertad asombrosa, pero siempre con la guía o la palabra justa como para encauzar las ideas desparramadas en el camino. Quizá sea justo decir que los investigadores, en general, no solemos ser descubridores: no tenemos raptos de inspiración repentina que resulta en un descubrimiento, en una noticia. Por el contrario, somos constructores de historias, que se van montando unas sobre otras; muchas de historias son la herencia de nuestros maestros, que a su vez las recibieron de sus propios maestros y, entre todos, intentamos ir agregando capítulos, detalles y nuevos personajes a esta gran trama de la ciencia.

¿Y cómo fue trabajar con Daniel? Fue, sin duda, un verdadero aprendizaje: a pensar y repensar preguntas, a mirar y exprimir los datos hasta que nos contaran algo inesperado, a pasarnos noches en el laboratorio en busca del tiempo perdido en el reloj biológico. Aprender, también, a seguir construyendo esa historia interminable. Como corresponde, tuvimos nuestras (sanas) desavenencias pero eso, como descubrí mucho después, también era parte de aprender a moverse en la ciencia, de

robarle detalles escondidos al mundo, al cerebro, al tiempo.

Años más tarde, el maestro nos

convirtió en colegas (y, de nuevo, hablo por muchos de sus discípulos)... pero no dejamos de seguir aprendiendo. Por eso vale la pena

destacarlo y reconocerlo hoy, que sigue tan activo como siempre (¡o quizá más que siempre!). Por eso al maestro, con cariño.

ESTUDIOS BÁSICOS Y CLÍNICOS SOBRE LA MELATONINA COMO EJEMPLO DE MEDICINA TRASLACIONAL

Palabras clave: Melatonina; neurociencias; medicina del sueño; insomnio; abuso de benzodiazepinas; enfermedad de Alzheimer.
Key words: Melatonin; neurosciences; sleep medicine; insomnia; benzodiazepine abuse; Alzheimer's disease.

■ Daniel P. Cardinali

BIOMED-UCA-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina, Buenos Aires

danielcardinali@fibertel.com.ar
Web: www.daniel-cardinali.blogspot.com

■ RESUMEN

A esta altura de la vida uno se siente tentado a detenerse y reflexionar sobre lo que la vida profesional le ha deparado. En mi caso se cumplen 50 años de mi relación con la glándula pineal y la melatonina y reconozco la inmensa fortuna de haberme vinculado desde el inicio de mi carrera con un tema como éste, cuando recién se habían sentado las bases para el reconocimiento de la melatonina como "hormona de la oscuridad". Ello me permitió contribuir a elucidar el mecanismo y significado del principal producto pineal y llevarlo a una etapa de aplicación terapéutica como la actual. Como tal es un ejemplo de medicina traslacional llevado a cabo totalmente en el país y con el apoyo de CONICET, La Universidad de Buenos Aires y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

■ 1. EL PERSONAJE (DE LA RESEÑA...)

Un resumen biográfico puede verse bajo el título "Vínculos de Interés" en www.daniel-cardinali.blogspot.com. Nací en Buenos Aires en 1943 en el barrio de Villa Pueyrredón, hijo de un matrimonio tipo de origen gallego mi madre (de Lugo, en la Galicia profunda) e italiano mi padre (de los Castelli romani). Mis abuelos habían llegado a principio de siglo a la Argentina para incorporarse a una sociedad que supo dejar espacio para la movilidad social, al menos en aquellos años.

La influencia de mi madre, Elisa Carreira, fue fundamental para formar mi carácter. Su objetivo era salir de la rueda de la pobreza mediante la educación. Ella me inculcó, con la ayuda de mi padre, Amado Héctor Cardinali, los valores de la superación y del trabajo a ultranza como entretenimiento cotidiano, que no

me han abandonado hasta ahora. A ambos les debo gran parte de lo que soy.

Otra de las grandes deudas es para con la mujer que fue mi compañera durante 50 años de mi vida, Adriana Teresa del Castello, a la que conocí cuando yo tenía sólo 15 años. Tuvimos 3 hijos, Mariana nacida el 1970 y hoy arquitecta, Pablo Daniel, nacido en 1974 y hoy contador público nacional, y Fernando Daniel, nacido en 1977, médico egresado de la UBA que se desempeña como especialista en obstetricia y ginecología en Madrid. Ese medio siglo de convivencia matrimonial fue destruido por la malignidad de un cáncer que terminó con la vida de Adriana en junio del 2008. Mi segunda esposa, Ana Inés Casella, me acompaña con devoción y paciencia infinitas desde hace 3 años en esta etapa final de mi vida científica.

Mi vocación de médico fue esculpida tempranamente por un amigo cercano de mis padres, el Dr. David Goldenstein, típico médico de barrio que teniendo yo 10 años, me llevaba dos o tres veces por semana a acompañarlo en sus visitas a domicilio. Yo al principio lo esperaba en el auto, pero con el tiempo me concedió el privilegio de ser testigo de su tremenda habilidad para entender, no al “cáncer de hígado”, sino a ese único ser, con historia propia que sufría su enfermedad de una manera personal e intransferible. Mi dedicación a la educación médica se la debo en gran parte a él, ya que creo que el futuro de la medicina está en reencontrar a ese tipo de médico.

Durante mi carrera en la Facultad de Medicina de la Universidad del Salvador llegó la etapa de mi formación científica. El maestro que más me influyó fue el Dr. Jorge Rosner, entonces Profesor de Fisiología y que a la postre fue el Director de mi tesis Doctoral. Desde los primeros años de estudiante de Medicina supe que mi vocación estaba en la investigación biomédica básica. Sin embargo, también intuí que el éxito de la investigación en Medicina se basa en haber satisfecho las exigencias de la formación clínica de la mejor forma posible. Por ello en los últimos años de la carrera me desempeñé con devoción como practicante de la guardia de los días lunes en el entonces Policlínico General San Martín.

Pero cuando me recibí, volví al laboratorio de Investigaciones Endocrinas de la Universidad del Salvador como becario de Iniciación del CONICET. Mi tesis doctoral tuvo que ver con el papel de la melatonina y de la glándula pineal en un animal alejado del hombre, pero sin embargo un buen modelo para los cambios estacionales de las funcio-

nes fisiológicas, el pato doméstico. Desde ese entonces mi vínculo con la melatonina no se ha roto: la línea de investigación que he seguido a lo largo de mi carrera científica se ha orientado al estudio de los aspectos fisiológicos y farmacológicos de los osciladores circadianos y de su señal cronobiológica principal, la melatonina. Estos estudios han contribuido a la introducción de la melatonina como primer “cronobiótico” de utilidad clínica, es decir, un agente efectivo para “mover las agujas” del reloj circadiano, afectado en distintas patologías.

La identificación en 1958 de la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina, o N-[2-(5-metoxi-1H-indol-3-il) etil] acetamida en la nomenclatura de IUPAC) representó un hito fundamental en la historia de la pineal (Lerner y col., 1958). Aaron Lerner, un distinguido dermatólogo interesado en el vitíligo, fue su descubridor en búsqueda del producto pineal que aclaraba la piel de los anfibios. Luego de una ciclópea tarea bioquímica llevada a cabo durante 4 años (unos pocos microgramos de melatonina obtenidos a partir de 250000 pineales bovinas, aproximadamente 100 kg de material original) Lerner verificó con decepción que la melatonina no cambiaba el color de la piel humana y que sólo producía somnolencia al administrarse a voluntarios sanos. Hacia 1964, Axelrod y col. habían caracterizado las vías biosintéticas de la melatonina (Axelrod, 2003) y Reiter y col. habían encontrado el primer sentido fisiológico de esta señal: servir como código químico de la noche en las especies con apareamiento estacional (Reiter, 1983). Retomaba su rumbo la interpretación de la función pineal, tan jerarquizada en etapas precientíficas (“sitio donde se expresaba el alma” según René Descartes) y tan denostada por los estudios anatómicos del siglo XIX (“órgano vestigial, carente

de significado en vertebrados superiores”) (Cardinali, 2014).

Me enteré del descubrimiento de la melatonina en 1963, como estudiante de fisiología teniendo como libro de base la primera edición de *Principles of Medical Physiology* de William Ganong, una obra señera que me ha acompañado en sus sucesivas ediciones (ha llegado a la vigésimo cuarta) en mi tarea docente en fisiología. Este libro fue publicado 1 año después de haberse efectuado el descubrimiento de la melatonina por Aaron Lerner.

En 1968 publiqué mi primer trabajo sobre la función de la melatonina en la estacionalidad reproductiva del pato doméstico y en los años transcurridos desde entonces tuve la fortuna de hacer el periplo máspreciado para un investigador biomédico, desde un insospechadamente académico tema de investigación básica (cómo y para qué la glándula pineal secreta melatonina en el pato) hasta la definición de su aplicación clínica como agente natural de promoción del ritmo sueño-vigilia en los seres humanos.

■ 2. QUÉ ES LA MELATONINA

La variación luz - oscuridad en la síntesis de melatonina por los pinealocitos es el hecho esencial que explica la participación de la glándula pineal en la fisiología de los ritmos biológicos (Cardinali, 1981). La función de la melatonina es doble: por un lado “abre las puertas del sueño” al inhibir al caer la tarde la actividad promotora de la vigilia del marcapasos circadiano central, los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo (NSQ) (Lewy y col., 2006). A su vez la melatonina es la “hormona de la oscuridad”, código químico de la duración de la noche, habiéndose establecido el papel de la glándula pineal en la transmisión de informa-

ción luminosa al sistema neuroendocrino. La melatonina representa una "manecilla" del reloj biológico en el sentido que responde a señales provenientes del NSQ y que la variación temporal del ritmo de melatonina indica el estado del reloj, tanto en términos de fase (horario en el reloj interno en relación con el horario externo) como de amplitud (Pandi-Perumal y col., 2008).

La melatonina es el prototipo de los "cronobióticos", fármacos utilizados para sincronizar y aumentar la amplitud de los ritmos circadianos (Cardinali y col., 2008). Un análogo sintético de la melatonina (tasimelton, Hetlioz[®], Vanda Pharmaceutical) fue aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) en EEUU en 2013 para su uso en el trastorno circadiano del sueño con ritmo diferente de 24 horas de individuos ciegos. En el mercado argentino la melatonina fue introducida como medicamento para el insomnio en 1995 (Melatol[®], Elisium) y existen análogos de la melatonina utilizados con este fin en EEUU (ramelton, Rozerem[®], Takeda) así como para el tratamiento de la depresión (agomelatina, Valdoxan[®], Servier; Vestin[®], Gador) aprobada por la *European Medicines Agency* (EMA) en Europa y por ANMAT en la Argentina.

A comienzos de los '70 y en el Laboratorio de Regulación Neuroendocrina del Instituto Tecnológico de Massachusetts en colaboración con Richard Wurtman y Harry Lynch hicimos los primeros estudios sobre la unión de melatonina a proteínas transportadoras en plasma, identificándose a la albúmina en ese rol (Cardinali y col., 1972). También en ese entonces, y en colaboración con Markku Hyyppa evaluamos la captación y metabolismo de ³H-melatonina cuando se administraba intracisternalmente a ratas (Cardinali y col., 1973). Para aquellos estudios

utilizábamos un primitivo método de síntesis de melatonina radiactiva: se hacía reaccionar anhídrido acético marcado con ³H (de una actividad específica muy baja: 400 Ci/mol) con metoxitriptamina. Si bien pudo obtenerse evidencia indirecta de un mecanismo neural saturable de captación (la melatonina no marcada) estábamos lejos de poder lograr la descripción del receptor de melatonina con un radioisótopo de actividad específica tan baja.

En la década de los '80 comenzaba a cobrar interés la observación de Aaron Lerner, el descubridor de la melatonina, sobre la somnolencia producida por la melatonina cuando se la administraba a sí mismo y a sus pacientes (Lerner y Nordlund, 1978). Por ese tiempo nuestro laboratorio en Buenos Aires, en el Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales, CONICET, había adquirido gran experiencia en la determinación de todo tipo de receptores por métodos de unión de alta afinidad y sólo esperábamos la introducción en el mercado de melatonina tritiada de alta actividad específica para usarla en nuestras preparaciones y detectar los posibles sitios receptores. En 1977, uno de los principales proveedores de material radiactivo, New England Nuclear, introdujo en el mercado melatonina tritiada de alta actividad específica (30 Ci/mmol) y una vez que contamos con ese material en pocas semanas con la Dra. María Irene Vacas, primera tesista de mi laboratorio, y un estudiante de medicina ayudante, Eduardo Estévez, identificamos los receptores cerebrales de melatonina en áreas del cerebro bovino y luego de rata (Cardinali y col., 1978, 1979). En otros estudios verificamos los cambios en la concentración de receptores en correlación con los niveles circulantes de melatonina y el estado de luz ambiental (Vacas y

Cardinali, 1979). Rápidamente otros investigadores confirmaron nuestros resultados pero hacia 1981 *New England Nuclear* decidió por problemas técnicos de estabilidad retirar del mercado la ³H-melatonina de alta actividad específica, lo que detuvo nuestras investigaciones sobre el tema.

Hacia 1983 se había avanzado notablemente en las técnicas autorradiográficas e inmunohistoquímicas de detección de receptores y se había introducido un ligando yodado de la melatonina, la 2-¹²⁵I-melatonina, lo que hizo explotar el conocimiento en el campo de los receptores de melatonina, culminando con el clonado en la década de los '90 de estos receptores. En base a sus propiedades cinéticas, especificidad y localización se han identificado distintos receptores para la melatonina tanto en el SNC como en la periferia. Se han clonado los receptores MT₁ y MT₂ (Dubocovich y col., 2010), todos ellos pertenecientes a la superfamilia de receptores de membrana asociados con proteínas G. Estos receptores median la inhibición por melatonina de la adenilato ciclasa (y en el caso del receptor MT₂, de la guanilato ciclasa) y participan en la acción de la melatonina sobre la fase y amplitud de los ritmos circadianos. Por su liposolubilidad la melatonina atraviesa las membranas y se asocia con proteínas citoplasmáticas como calmodulina y tubulina, con importantes cambios en el citoesqueleto (Benitez-King, 2006). Por último la melatonina accede al núcleo celular donde también se han descrito sitios receptores, no totalmente identificados aún. El receptor nuclear de la melatonina pertenece a la superfamilia de los receptores huérfanos RZR/ROR y participa en la inmunomodulación (Hardeland y col., 2011).

Tanto en el citoplasma como en el núcleo celular la melatonina tiene importantes efectos antioxidantes y de *scavenger* (barredor) de radicales libres, en gran parte independientes de receptor (Hardeland y col., 2011). Estos efectos se ejercen de tres maneras: (a) La melatonina tiene actividad de *scavenger*. (b) La melatonina se metaboliza a otros compuestos de gran actividad antioxidante. (c) La melatonina es un antioxidante indirecto, estimulando la síntesis de enzimas antioxidantes e inhibiendo la de enzimas prooxidantes. Existe también un efecto antiapoptótico y citoprotector de la melatonina ejercido en condiciones de isquemia (no relacionado con radicales libres) y atribuibles a una actividad estabilizadora de la membrana mitocondrial (Acuña-Castroviejo y col., 2012).

■ 3. ESTUDIOS BÁSICOS SOBRE LA INTERACCIÓN DE LA MELATONINA Y LAS BENZODIACEPINAS (BZP)

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC presente en interneuronas de circuitos cerebrales, en neuronas de proyección en algunas áreas cerebrales, en las células horizontales en retina y por sobre todo, en la mayoría de las neuronas de los NSQ (Moore y Speh, 1993). Hacia comienzos de los '80 no había idea clara de los sistemas neuronales afectados por la melatonina en el SNC pero el GABA era un candidato posible. Nos manejamos con la premisa que para demostrar que un neurotransmisor estaba implicado en la acción de la melatonina dos requisitos debían cumplirse: (a) el neurotransmisor debía mostrar cambios dinámicos como consecuencia de la inyección de melatonina; (b) la obliteración funcional del neurotransmisor debía modificar de manera significativa el efecto de

la melatonina. Cabe señalar que existían datos indicando que las vías monoaminérgicas no eran importancia para el efecto cronobiótico de la melatonina ya que la inyección intraventricular de 6-hidroxidopamina y/o 5,7-dihidroxitriptamina, que suprime los niveles de catecolaminas e indolaminas, no alteraban la acción resincronizadora de melatonina en los cambios de fase de los ritmos circadianos.

Dedicamos entonces considerables esfuerzos para examinar la participación de neuronas GABAérgicas en los efectos cerebrales de la melatonina (Rosenstein y Cardinali, 1990). Ante la activación de receptores de GABA tipo A se inhibe el disparo neuronal mediante el aumento de la conductancia al Cl⁻, un efecto alostéricamente modificado por las BZP. En nuestro laboratorio se demostró una ritmicidad diurna en el número de receptores de alta afinidad para GABA y BZP en cerebro de rata que se alteraba con la pinealectomía y se restauraba por la administración de melatonina. Dado que las mediciones del contenido arrojaban una mala evaluación de la dinámica del transmisor estudiamos los ritmos circadianos del *turnover* de GABA en la corteza cerebral, el hipotálamo medio basal (HMB), el cerebelo y la glándula pineal de hámsteres mantenidos bajo iluminación compatible con días largos o cortos. En días largos (es decir, 14 horas de luz por día), el recambio del GABA en la corteza cerebral, PMBH, el cerebelo y la glándula pineal exhibió una relación de fase significativa, mostrando valores máximos hacia la primera mitad de la noche (Cardinali y col., 1997)

Que los cambios en el GABA en el cerebro de hámster están asociados con cambios concomitantes en la activación del receptor GABA tipo A se demostró por distintos experi-

mentos en los que estudiamos el fenómeno fisiológicamente relevante del receptor GABA A, el ionóforo de Cl⁻ (Rosenstein y Cardinali, 1986). Pudimos determinar entonces que la melatonina afectaba significativamente a este sistema de neurotransmisión cerebral. Otros grupos de investigación establecieron la participación en la acción de la melatonina de receptores MT₁ y de las señales intracelulares desencadenadas por éstos (Fig. 1).

El segundo criterio que nos habíamos planteado como necesarios para caracterizar al GABA como efector específico de la melatonina era que la obliteración funcional del neurotransmisor debía modificar de manera significativa el efecto de la melatonina. Hacia 1989 se incorporó a nuestro grupo de investigación Diego Andrés Golombek, un Licenciado en Ciencias Biológicas recién graduado de la UBA, con el objetivo de incorporar metodologías cronobiológicas a las líneas de investigación en marcha. Golombek demostró en una serie de trabajos muy ingeniosos la dependencia de la actividad de la melatonina sobre diversos parámetros conductuales de la integridad de los mecanismos GABAérgicos (Golombek y col., 1992). Entre estos parámetros se estudió la actividad locomotora del hámster, la analgesia en el ratón (base del uso de la melatonina en cuadros de hiperalgesia central como la fibromialgia, cefaleas y colon irritable), la actividad anticonvulsivante (base del uso de melatonina como droga antimicrobial) y su efecto ansiolítico (utilizado hoy, como veremos, en clínica para reducir el consumo de BZP). Estos trabajos fueron los primeros en identificar que la acción central de la melatonina en el sistema GABAérgico y de BZP explica la actividad cronobiótica de la molécula (Golombek y col., 1996).

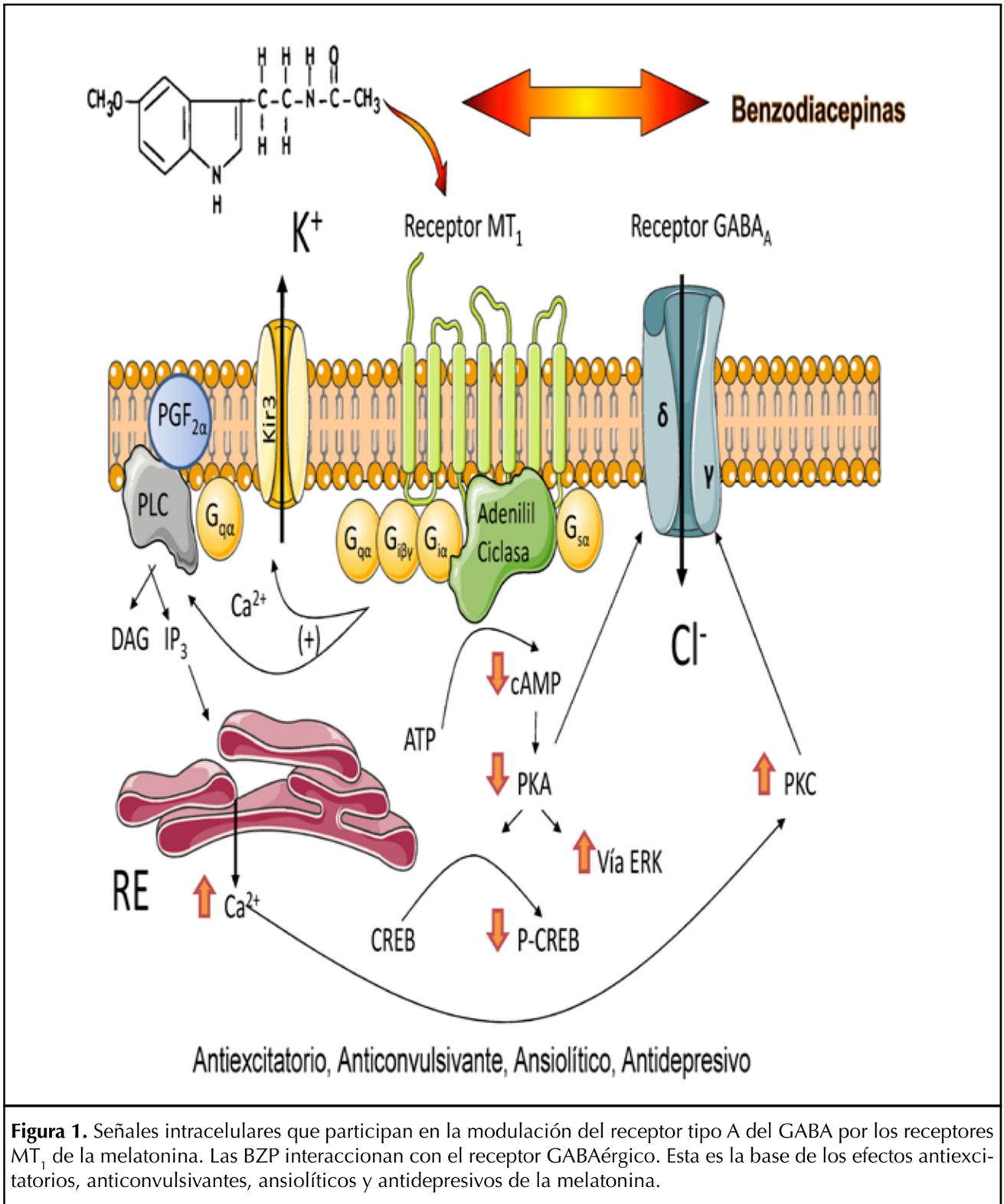


Figura 1. Señales intracelulares que participan en la modulación del receptor tipo A del GABA por los receptores MT₁ de la melatonina. Las BZP interaccionan con el receptor GABAérgico. Esta es la base de los efectos antiexcitatorios, anticonvulsivantes, ansiolíticos y antidepresivos de la melatonina.

La Fig. 2 resume una serie de estudios llevados a cabo por Golombek para definir la participación de mecanismos GABAérgicos del cerebro en los efectos conductuales de

la melatonina en roedores. En primer término caracterizó la cronofarmacología de la melatonina para los diversos parámetros conductuales determinados. Para lograr una efec-

tiva inhibición de la actividad GABAérgica se empleó flumazenil, un antagonista del receptor BZP con cierta actividad agonista inversa del receptor. Así efectos de la melatoni-

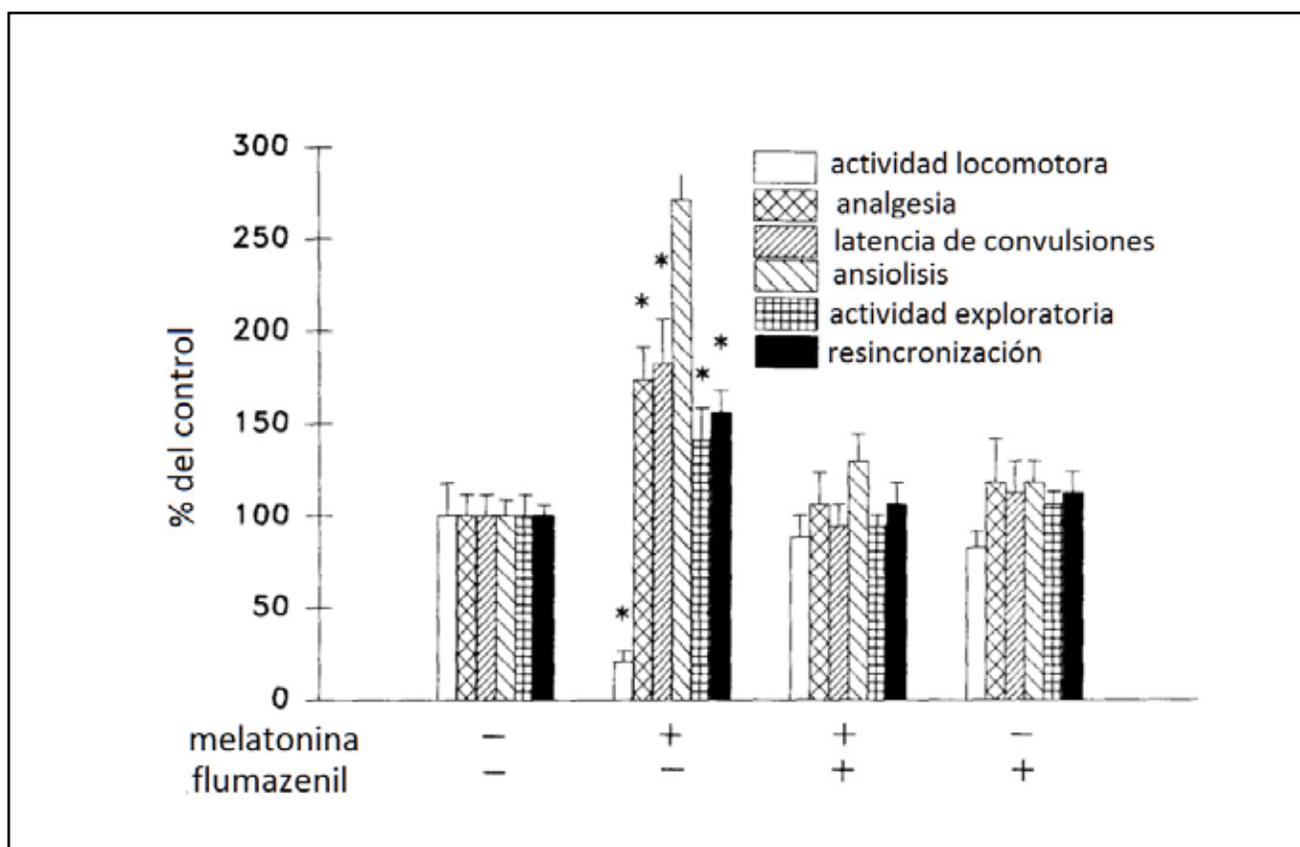


Figura 2. Bloqueo por flumazenil, un bloqueante de receptores centrales de BZP, del efecto de la melatonina sobre varias conductas en rata, ratón y hámster. Datos de Golombek y col. (1992).

na como el de la analgesia, comportamiento locomotor, convulsiones, actividad exploratoria, ansiolisis y resincronización circadiana fueron inhibidos por la administración de flumazenil (Fig. 2) (Golombek y col., 1993).

■ 4. ESTUDIOS CLÍNICOS SOBRE LA INTERACCIÓN DE LA MELATONINA Y LAS BZP

Con la introducción de la melatonina (Melatol[®]) como fármaco para el tratamiento del insomnio en adultos mayores autorizada por ANMAT para su uso en el mercado argentino pudieron hacerse los primeros estudios en ancianos internados en el Centro Médico Ingeniero A. Rocca, Hospital Italiano de Buenos Aires, entonces dirigido por el distinguido gerontólogo Isidoro Fainstein. El primero fue un estudio piloto de corto

plazo diseñado para evaluar la eficacia y tolerancia de la melatonina en el tratamiento de los trastornos del sueño en adultos mayores (Fainstein y col., 1997). Se estudiaron 41 pacientes (28 mujeres y 13 hombres, promedio de edad 74 años) agrupados en: (a) 22 pacientes con trastornos del sueño; (b) 9 pacientes con trastornos del sueño y síntomas de depresión; y (c) 10 pacientes con trastornos del sueño y demencia. Todos los pacientes recibieron 3 mg de melatonina en cápsulas de gelatina por vía oral 30 min antes de acostarse, durante 21 días. La calidad del sueño y el alerta durante el día fueron evaluados globalmente, por medio de consultas clínicas estructuradas y de agendas del sueño completadas por los pacientes (o por quienes los cuidaban en el caso de los pacientes con demencia). Comenzando en el 2° o 3° día del tra-

tamiento, la melatonina mejoró significativamente la calidad del sueño y disminuyó el número de despertares en pacientes con trastornos del sueño con o sin depresión asociada. La estimación de la función del día siguiente (es decir, alerta matutina y durante el día) mejoró significativamente sólo en los pacientes que mostraban exclusivamente trastornos del sueño. Si bien los pacientes con demencia no revelaron mejoría significativa de la calidad del sueño, la agitación vespertina disminuyó significativamente en 70% de ellos. Esto se reflejó en el coeficiente de varianza a la hora de acostarse, el que disminuyó significativamente en pacientes con demencia cuando fue reevaluado en los días 19 a 21 del tratamiento. Cuatro (31%) de los 13 pacientes con insomnio primario que recibían BZP como tratamiento en forma concomitante redujeron la

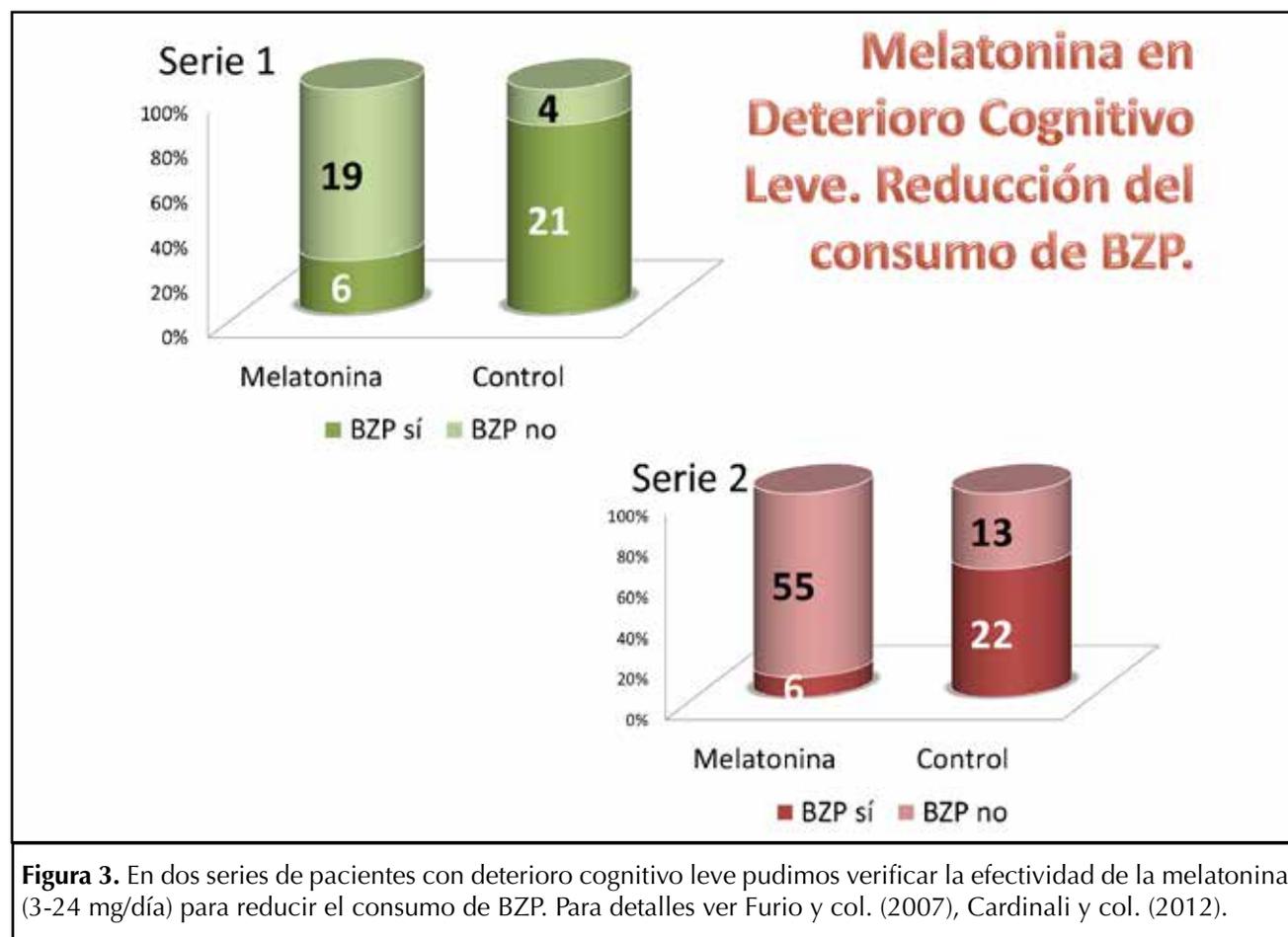
dosis (del 50 al 75% de la dosis inicial) y 4 (31%) discontinuaron el uso de estos agentes hipnóticos. De los 7 pacientes con depresión y 7 con enfermedad de Alzheimer que recibieron BZP en forma concomitante, 2 (29%) en cada grupo redujeron el uso en más del 50%. No fueron reportados efectos colaterales atribuibles al tratamiento con melatonina (Fainstein y col., 1997). Así se confirmó la sospecha que teníamos de tiempo atrás: la melatonina podía ser efectiva para sacar de la dependencia de BZP a los pacientes.

En el mismo año Dagan y col. (1977) publicaron un reporte de un caso sobre la eficacia de 1 mg de melatonina de liberación controlada para interrumpir el uso de BZP en una mujer de 43 años que había sufrido de insomnio durante los últimos 11 años. Ese mismo grupo

de investigación publicó en 1999 en un estudio doble ciego, controlado con placebo en 34 pacientes ambulatorios con edad entre 40-90 años con insomnio primario, que tomaban BZP y que tenían bajo niveles de producción de melatonina (Garfinkel y col., 1999). Catorce de los 18 sujetos que habían recibido melatonina (2 mg de liberación prolongada) discontinuaron la terapia con BZP vs. 4 de 16 en el grupo con placebo.

Otro estudio abierto de nuestro grupo de investigación apoyó la eficacia de la melatonina de liberación rápida para disminuir el uso de BZP. Examinamos la seguridad y eficacia de la melatonina en 22 mujeres con insomnio a las que administramos 3 mg de melatonina por vía oral diariamente durante 6 meses, 30 min antes del tiempo de sueño esperado

(Siegrist y col., 2001). Veinte de las 22 pacientes recibían BZP y continuaron con su ingesta durante el tratamiento. Al cabo de los 6 meses no se observaron cambios en los niveles séricos de prolactina, FSH, TSH o estradiol ni hubo ninguna indicación de alteración hematológica o bioquímica en análisis de rutina. La melatonina aumentó significativamente la calidad y duración del sueño y disminuyó la latencia del sueño y el número de episodios de despertar. También mejoró el estado de alerta al día siguiente. La excreción urinaria del metabolito de la melatonina 6-sulfatoximelatonina se correlacionó con la edad en este grupo de pacientes. Trece de los 20 pacientes que tomaban BZP abandonaron su uso y en otros 4 pacientes se redujo la dosis de BZP al 25-66 % de la dosis inicial (Siegrist y col., 2001).



En colaboración con el Dr. Ignacio Brusco estudiamos distintos aspectos de la aplicación de melatonina en pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) (Brusco y col., 1998a; Brusco y col., 1998b). Pudimos verificar su efecto beneficioso en los trastornos del sueño y en la agitación vespéral así como en la evolutividad de la enfermedad. Pero esta acción terapéutica fue mucho más clara en el deterioro cognitivo leve, un síndrome heterogéneo etiológicamente definido por el déficit cognitivo como pródrómo de la demencia tipo Alzheimer. En nuestro laboratorio hemos reportado dos análisis retrospectivos de pacientes ambulatorios con deterioro cognitivo leve que habían recibido diariamente 3-24 mg de melatonina p. o. antes de acostarse durante 15 a 60 meses (Cardinali y col., 2012; Furio y col., 2007). Hubo una mejora significativa del rendimiento cognitivo y emocional y los ciclos de sueño / vigilia diaria en ambos grupos. Como se muestra en la Fig. 3, la comparación del perfil de medicación de pacientes con deterioro cognitivo leve indicó que 21 de 25 pacientes en el grupo control de la serie 1 y 22 de 35 pacientes en el grupo control de la serie 2 requirieron BZP mientras que sólo 6 de 25 pacientes en la serie 1 y 6 de 61 pacientes en la serie 2 tratados con melatonina requirieron BZP como tratamiento. Ninguno de los pacientes tratados con melatonina evolucionó a EA.

¿Cuál es la situación actual en relación a estos efectos cronobiológicos de la melatonina sobre el sueño que observamos en nuestros iniciales estudios clínicos? En relación al sueño, se sucedieron varios estudios en general indicativos de un efecto significativo regulador del sueño de la melatonina y un reciente meta-análisis así lo avala (Ferracioli-Oda y col., 2013). En este meta-análisis se incluyeron 19 estudios que involu-

craron 1683 sujetos. La melatonina demostró eficacia significativa en la reducción de la latencia del sueño y en el aumento del tiempo total de sueño. Los ensayos de mayor duración y el uso de dosis más altas de melatonina demostraron mayores efectos. La calidad del sueño mejoró significativamente en los sujetos que tomaron melatonina (Ferracioli-Oda y col., 2013).

Otro hecho relevante ha sido la aprobación como fármaco para el tratamiento del insomnio en los gerontes por la EMA en 2007 de una forma de liberación prolongada de 2 mg de melatonina (Circadin^R, Neurim, Tel-Aviv). La melatonina adquirió así un status que permite su incorporación en el vademécum de varios países europeos. Fue enfatizado el hecho que con la melatonina no hay evidencia de dependencia, síndrome de abstinencia, insomnio de rebote o influencia negativa en el estado de alerta durante el día. La prevalencia del insomnio primario varía entre el 1 % a 10 % de la población general y hasta un 25-30 % en los ancianos, para los cuales el tratamiento del insomnio es una clara necesidad médica. Así los costos directos e indirectos del insomnio representan una carga económica social sustancial. Las BZP y los agonistas del receptor de BZP (drogas Z: zolpidem, zaleplon, zopiclona) son los fármacos más comúnmente prescritos para el tratamiento del insomnio (Mandrioli y col., 2010). Varios meta-análisis de los riesgos y beneficios de estas opciones terapéuticas en pacientes de edad avanzada han reportado mejorías estadísticamente significativas del sueño, pero también han reportado un riesgo estadísticamente significativo de eventos adversos entre ellos algunos que constituyen una amenaza para la vida (Winkler y col., 2014). De hecho estos medicamentos sólo están aprobados por las autoridades regu-

latorias en tratamientos de no más de algunas semanas de duración debido a razones de seguridad.

Las drogas Z se usan, a diferencia de las BZP, exclusivamente para el tratamiento del insomnio y se supone que tienen una menor tendencia a inducir dependencia física y adicción que las BZP (Morin y Willett, 2009). Sin embargo, su seguridad sigue siendo motivo de preocupación. Ambos tipos de drogas producen a largo plazo tolerancia y adicción. Se han reportado efectos adversos en más del 40 % de los usuarios de ambos tipos de drogas sin diferencia entre las BZP y las drogas Z. En varios países se constata el consumo en exceso de BZP y de drogas Z, usadas por tiempos mucho más largos que las 4 semanas indicadas.

Uno de ellos es la Argentina. En el año 2011 se prescribieron en nuestro país más de 3 millones de recetas de medicamentos para dormir: un 22% más que 5 años atrás según registros del Sindicato Argentino de Farmacéuticos y Bioquímicos. Por año se venden 28 millones de unidades y unos 5 millones de argentinos consumen regularmente medicamentos para dormir (recetados y de venta libre). En el año 2013 el consumo de BZP creció más de 5% con respecto al año previo. Según un informe reciente, el clonazepam lidera el ranking de medicamentos con receta archivada más vendidos en el país entre enero y septiembre de 2013, con 6,4 millones de cajas seguido por el alprazolam (5,6 millones de cajas). El consumo de clonazepam, calculado por número de habitantes, es uno de los más altos del mundo, aunque se trata de una medicación con indicaciones muy precisas.

Así es claro que existe un uso abusivo de las BZP y drogas Z, que son los medicamentos más receta-

dos para dormir. Existe por lo tanto la necesidad de programas de educación masiva que alerten sobre estas consecuencias de la automedicación y sistemas de control más elaborados para evitar la venta ilegal sin receta archivada.

En Europa, las autoridades sanitarias han iniciado políticas y recomendaciones con el fin de disminuir el consumo de BZP y drogas Z. Sin embargo, las campañas no han tenido en general éxito, y a pesar de las directrices y recomendaciones nacionales, el uso de estas drogas ha seguido en aumento. La eficacia de la melatonina para reducir el consumo de BZP ha adquirido por lo tanto gran relevancia.

En un estudio retrospectivo de los datos de prescripción de melatonina de una base de datos longitudinal alemana se incluyeron a todos los pacientes que la utilizaron en el periodo abril de 2008 - febrero de 2009. De los 512 pacientes elegibles, 112 (22 %) eran usuarios de BZP/drogas Z. Aproximadamente un tercio de los pacientes interrumpieron el tratamiento con dichas drogas después de la administración de melatonina avalando así los efectos observados tempranamente en nuestro laboratorio (Kunz y col., 2012).

Otro reciente estudio farmacoepidemiológico tuvo como objetivo analizar y evaluar el impacto de la disponibilidad en el mercado de melatonina en las campañas para reducir el consumo de BZP/drogas Z vigentes en varios países europeos. En su conclusión se destaca que las campañas fracasaron cuando no se asociaron con la disponibilidad y reembolso de melatonina como agente de reemplazo (Clay y col., 2013).

Un estudio de vigilancia posterior a la comercialización de la melatonina de liberación prolongada (2

mg) se realizó en Alemania. Se examinó el efecto de 3 semanas de tratamiento sobre el sueño en 597 pacientes. La mayoría de los pacientes (77%) que utilizaban hipnóticos tradicionales antes del tratamiento de melatonina había dejado de usarlos y sólo el 5,6% de los pacientes no tratados previamente había iniciado dichos fármacos después de la interrupción de la melatonina (Hajak y col., 2015). Una ventaja importante del uso de la melatonina como un cronobiótico es que tiene un perfil muy seguro, por lo general es muy bien tolerado y, en algunos estudios, se ha administrado a pacientes a dosis muy grandes y durante largos períodos de tiempo sin ninguna potencialidad de abuso.

En conclusión, una gran proporción de los pacientes insomnes en tratamiento con BZP fallan en lograr una recuperación completa y sostenida y presentan síntomas residuales que hacen la recaída o recurrencia de la enfermedad más probable. Dado el impacto en la calidad de vida producido por el insomnio es necesario prestar más atención a la hora de evaluar el efecto del tratamiento sobre el funcionamiento diario de los pacientes. En este sentido, la mayoría de los problemas de seguridad con el uso de hipnóticos tipo BZP / drogas Z no se aplican a la melatonina, un hecho reconocido por la Asociación Británica de Psicofarmacología que recomendó la melatonina como tratamiento de primera línea en el insomnio pacientes mayores de 55 años y más (Wilson y col., 2010).

La medicina traslacional es una disciplina dentro de la investigación biomédica y en salud pública que tiene como objetivo mejorar la salud de los individuos y de la comunidad facilitando la "traducción" de los conocimientos básicos en las ciencias biomédicas en herramientas de diag-

nóstico y tratamiento de las enfermedades. Por un lado implica orientar el conocimiento de las ciencias básicas en la producción de nuevas terapias y procedimientos diagnósticos que hacen al directo tratamiento de las patologías. Por otro lado, busca asegurar que los nuevos tratamientos y el conocimiento científico lleguen a los enfermos y poblaciones para quienes son diseñados, y que sean implementados correctamente. Lo que acá resumimos es la experiencia de nuestro grupo de investigación como desarrollador de un concepto básico (interacción melatonina-BZP) y como iniciador de su aplicación clínica para reducir el consumo de BZP en pacientes insomnes, hecho reconocido hoy por estudios farmacoepidemiológicos. La melatonina se convierte así en la terapéutica de elección para reducir la dependencia de BZP en el tratamiento del insomnio en adultos mayores. Lo mostrado acá ejemplifica el concepto de medicina traslacional llevada a cabo totalmente en el país y con el apoyo de CONICET, La Universidad de Buenos Aires y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

■ 5. ALMA MÁTER

Como científico he tenido el enorme privilegio de desempeñar mi tarea íntegramente en el CONICET, al que puedo definir como mi alma máter. Alma máter ("madre nutricia") es un término que define desde hace cientos de años a la universidad en la cual uno se formó. La idea detrás es que la sabiduría era dada en ese momento y que luego persistía por toda la vida del egresado. Para un científico alma máter representa mucho más.

En mi caso, estrictamente identifico dos instituciones que representan lo que alma máter quiere expresar. Una es el CONICET, al cual estuve

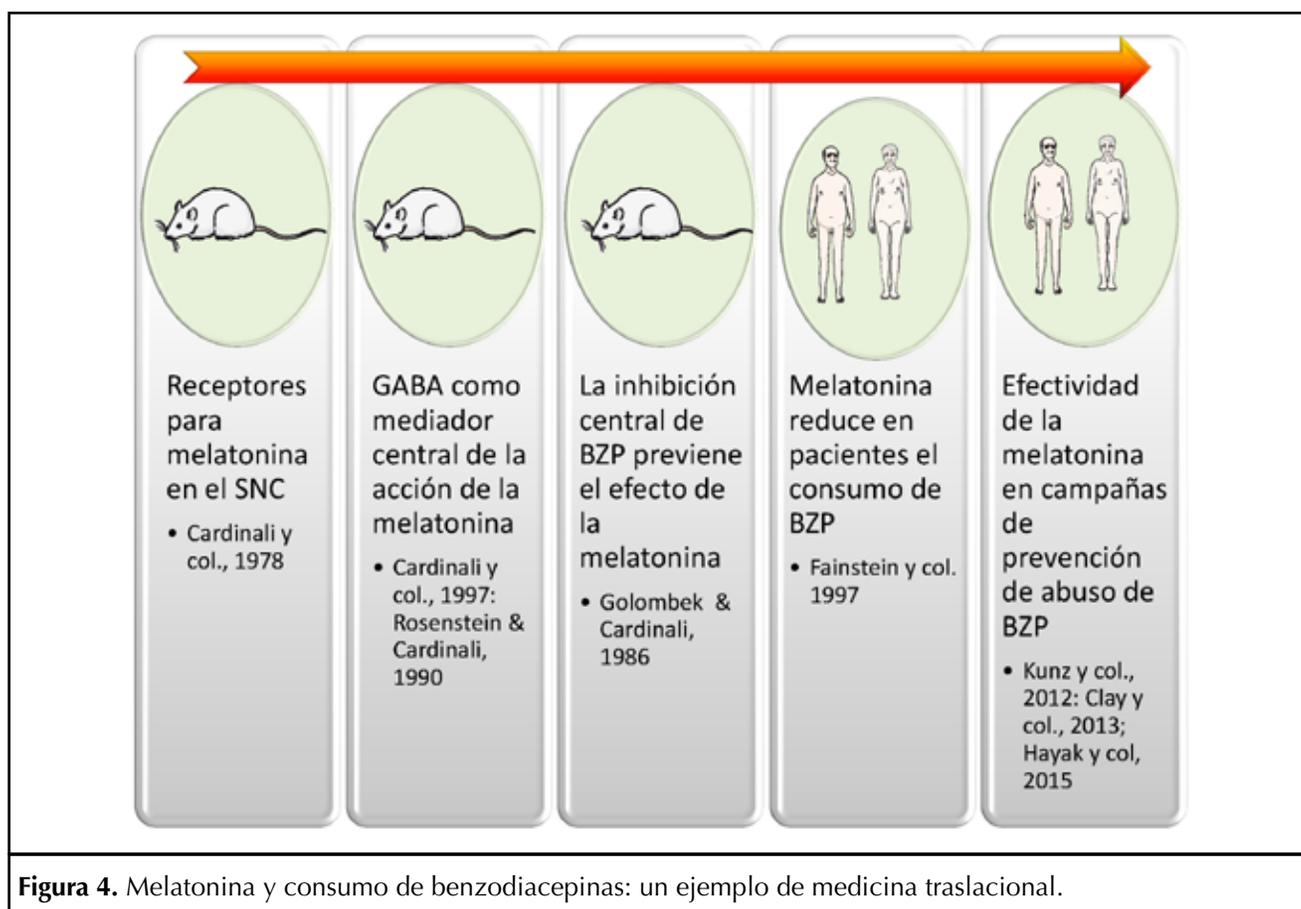


Figura 4. Melatonina y consumo de benzodiacepinas: un ejemplo de medicina traslacional.

vinculado por casi medio siglo desde mi Beca de Iniciación en 1968 y lo sigo estando como Investigador Superior contratado. Esto tiene una cierta imprecisión, porque el CONICET no es una universidad, pero su meritocrático sistema de evaluación permanente fue un constante estímulo en mi carrera y de alguna manera la “madre nutricia” que esculpió mi perfil científico y alimentó mi accionar. Si el sistema de evaluación permanente del CONICET se hubiera extendido a otras áreas de gestión y gobierno de la Argentina, otro hubiera sido el destino de nuestro país.

La segunda alma máter es la Universidad de Buenos Aires, también aquí utilizando el término con imperfección porque yo no me gradué en ella. Comencé mi vínculo con la UBA como Profesor Adjunto de Fisiología en la Facultad de Odontología en 1983 y luego de mi in-

corporación como Profesor Titular de la misma materia en la Facultad de Medicina en 1986 pude experimentar cuál era la verdadera acepción del término alma máter para un científico y docente.

Mi primera experiencia al respecto fue la casual elección del laboratorio dónde ubicar mis equipos, en el Instituto de Fisiología, sito en el 7° piso de la Facultad en la calle Paraguay. El Profesor Alejandro Paladini, distinguido docente y excepcional científico, entonces Director del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, era quien sufría en el 6° piso las obras de refacción de mi laboratorio. Un día Paladini me dijo “Mire Cardinali, en ese laboratorio que Ud. está modificando Leloir, Fasciolo, Taquini, Muñoz y Braun Menéndez purificaron la angiotensina, y yo, como ayudante alumno,

los asistía”. No sé si este comentario se trataba de una advertencia para que no alejara a los espíritus célebres de su sitio de reposo, pero me hizo experimentar la primera sensación de alma máter en el lugar.

Una frase muy repetida de Bernardo de Chartres, un maestro de la Filosofía del siglo XII, señala que cuando tenemos la fortuna de subirnos como enanos a los hombros de gigantes, podemos ver más, y más lejos que ellos, no por la agudeza de nuestra vista ni por la altura de nuestro cuerpo, sino porque somos levantados por su gran altura.

Una experiencia plena de esta sensación la tuve cuando pude pasar horas en la antigua biblioteca del Instituto de Fisiología. El cuadro era surrealista: uno entraba y veía los anaqueles polvorientos de lo que había sido la biblioteca más impor-

tante de América Latina en el área, hasta los años 60, etapa en que no sólo esta biblioteca sino la cultura toda se detuvo en el país. Fue un gran placer leer los debates sobre por ejemplo, el control neural de las glándulas endocrinas, en textos de Walter Cannon o Harry Friedgood, que inspiraron fuertemente nuestro trabajo (Cardinali 2014).

Ciertamente los “enanos a hombros de gigantes” no se limitan a repetir lo ya dicho, sino que al apoyarse en sus predecesores ven efectivamente más cosas y llegan más lejos (si bien es cierto que no olvidan lo que deben a quienes les abrieron camino en el pensamiento). En ese sentido tuvo en mi carrera una gran influencia el contacto con Richard J. Wurtman en mi estadía en Boston. Wurtman era Profesor de Neurociencias en el Instituto Tecnológico de Massachusetts dentro del proyecto conjunto MIT-Harvard, había sido un dilecto discípulo del premio Nobel Julius Axelrod y yo tuve la posibilidad de admirar la extraordinaria visión fisiológica de ambos en aquel momento.

Al pasar, quisiera transmitir a los jóvenes interesados en la ciencia la pérdida que sin casi percibirlo hemos experimentado con los extraordinarios avances de las fuentes bibliográficas digitalizadas. ¡Qué daño irreparable ha sido perder aquellas visitas periódicas a la biblioteca, con sus paneles en los que se exhibía el último número recibido de las revistas, que permitían que un tema no buscado entrara por el rabillo del ojo en una típica visión lateral, haciéndonos prestar atención a un insospechado tema nuevo! Todo eso se ha perdido hoy, y para colmo de males, hemos perdido también la herencia de los gigantes: ¿qué científico joven se preocupa hoy por los trabajos que no están digitalizados, la gran mayoría de la producción en

la ciencia de antes de los ‘60?

En todo caso, el alma máter de la UBA inspiró por un cuarto de siglo la actividad científica y docente de mi laboratorio. La libertad académica con la pude llevar a cabo esta tarea ha sido impecable y por ello estoy muy agradecido a la UBA como institución.

En los últimos 15 años me he volcado en forma creciente a actividades vinculadas con la Educación Médica. Fui entre 1997 y 2002 Miembro de la Comisión Asesora del Área Médica, Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU), Ministerio de Cultura y Educación. Esta Comisión elaboró los instrumentos técnicos con que hoy se evalúan las Carreras de Medicina en el país. Desde 1998 hasta el año 2000 fui Coordinador del Proyecto de Cambio Curricular en la Carrera de Medicina, Facultad de Medicina, UBA. Entre el año 2003 y 2008 actué como Coordinador del Grupo de Educación Médica de la Facultad de Medicina, Universidad Falavero y desde mayo del 2009 me desempeño como Director del Departamento de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina.

Cualquier obra científica, por brillante que sea, es incompleta si no está vinculada con la formación de discípulos. Siempre sostuve que para alcanzar el estamento más alto de la carrera de investigador, lo decisivo debía ser, ya no la producción individual sino la calidad de los discípulos formados. En ello he sido afortunado. Muchos de mis discípulos tesis y posdoctorandos ocupan hoy posiciones de importancia en Universidades e Institutos de Investigación del país y en el exterior.

Dentro del país debo mencionar

a la Dra. María I. Vacas, Profesora de Bioquímica, Facultad de Medicina, Instituto Universitario del Hospital Italiano, Buenos Aires, a la Dra. Ruth E. Rosenstein, Profesora Titular de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA, Investigador Principal del CONICET y merecedora de la Beca Guggenheim, al Dr. Diego A. Golombek, Profesor Titular de Fisiología, Universidad de Quilmes e Investigador Principal del CONICET, quien también recibiera la Beca Guggenheim, al Dr. Horacio E. Romeo, Profesor Titular, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina e Investigador Independiente, CONICET, al Dr. Eduardo Chuluyan, Investigador Principal del CONICET, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, a la Dra. Mónica N. Ritta, Profesora Asociada de Química Orgánica y Biológica, Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora e Investigador Independiente del CONICET, al Dr. Salvador Guinjoan, Jefe de la Sección de Neuropsiquiatría, FLENI, Buenos Aires, Investigador Clínico Independiente, CONICET y Profesor Adjunto de Psiquiatría, Facultad de Medicina, UBA, al Dr. Luis Ignacio Brusco, Investigador Clínico Independiente, CONICET y Profesor Titular de Psiquiatría, Facultad de Medicina, UBA y al Dr. Daniel E. Vigo, Profesor Titular, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina e Investigador Adjunto, CONICET.

Otros ocupan posiciones expectantes en el exterior, como el Dr. Pedro R. Lowenstein, Professor of Neurosurgery and Professor of Cell and Developmental Biology, *University of Michigan*, el Dr. Pablo V. Gejman, Professor of Psychiatry, Director, *Center for Psychiatric Genetics, Department of Psychiatry, The Pritzker*

School of Medicine, The University of Chicago, el Dr. Javier Stern, Professor of Physiology, *Georgia Health Sciences University*, Augusta, el Dr. Guillermo González Burgos, Associate Professor, *Translational Neuroscience Program, Department of Psychiatry, University of Pittsburgh*, el Dr. Darío Acuña Castroviejo, Catedrático de Fisiología. Facultad de Medicina, Universidad de Granada y la Dra. Ana I. Esquifino, Catedrático de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

■ 6. UNA ÚLTIMA REFLEXIÓN

Ella tiene que ver con el término serendipia. ¿Hubiera sido posible esta historia sin la ayuda de la fortuna, independientemente del talento que el investigador pudiera haber tenido? Según la wikipedia una serendipia es un descubrimiento o un hallazgo afortunado e inesperado que se produce cuando se está buscando otra cosa. También puede referirse a la habilidad de un sujeto para reconocer que ha hecho un descubrimiento importante aunque no tenga relación con lo que busca. En términos más generales se puede denominar así también a la casualidad, coincidencia o accidente, o más en criollo, "chiripa".

Debo reconocer que mi historia no sería posible sin la fortuna de haber coincidido cronológicamente con el nacimiento de un tema, el de la melatonina. La melatonina es hoy una gran esperanza como medicación de la disrupción del ritmo sueño/vigilia en nuestra Sociedad 24/7 y tiene en el futuro amplios usos. ¿Cómo prevendremos la insostenible carga de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas si no contáramos con recursos preventivos de bajo costo e inoocuos como la melatonina? ¿Por qué no probióticos o

lácteos fortalecidos con neuroprotectores?

■ BIBLIOGRAFÍA

Acuña-Castroviejo, D., Carretero, M., Doerrier, C., Lopez, L.C., Garcia-Corzo, L., Tresguerres, J.A., Escames, G., 2012. Melatonin protects lung mitochondria from aging. *Age (Dordr.)* 34, 681-692.

Axelrod, J., 2003. Journey of a late blooming biochemical neuroscientist. *J. Biol. Chem.* 278, 1-13.

Benitez-King, G., 2006. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J. Pineal Res.* 40, 1-9.

Brusco, L.I., Marquez, M., Cardinali, D.P., 1998a. Melatonin treatment stabilizes chronobiologic and cognitive symptoms in Alzheimer's disease. *Neuroendocrinol. Lett.* 19, 111-115.

Brusco, L.I., Marquez, M., Cardinali, D.P., 1998b. Monozygotic twins with Alzheimer's disease treated with melatonin: Case report. *J. Pineal Res.* 25, 260-263

Cardinali, D.P., 1981. Melatonin. I A mammalian pineal hormone. *Endocr. Rev* 2, 327-346.

Cardinali DP. 2014. Cincuenta Años con la Piedra de la Locura. Apuntes Autobiográficos de un Científico Argentino. Edición del Autor, Buenos Aires. www.daniel-cardinali.blogspot.com

Cardinali, D.P., Golombek, D.A., Rosenstein, R.E., Cutrera, R.A., Esquifino, A.I., 1997. Melatonin site and mechanism of action: Single or multiple? *J. Pineal Res.* 23, 32-39.

Cardinali, D.P., Hyyppa, M.T., Wurtman, R.J., 1973. Fate of intracis-ternally injected melatonin in the rat brain. *Neuroendocrinology* 12, 30-40.

Cardinali, D.P., Lynch, H.J., Wurtman, R.J., 1972. Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology* 91, 1213-1218.

Cardinali, D.P., Pandi-Perumal, S.R., Srinivasan, V., Spence, D.W., Trakht, I., 2008. Therapeutic potential of melatonin agonists. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* 3, 269-279.

Cardinali, D.P., Vacas, M.I., Boyer, E.E., 1978. High affinity binding of melatonin in bovine medial basal hypothalamus. *IRCS Medical Science* 6, 357.

Cardinali, D.P., Vacas, M.I., Boyer, E.E., 1979. Specific binding of melatonin in bovine brain. *Endocrinology* 105, 437-441.

Cardinali, D.P., Vigo, D.E., Olivar, N., Vidal, M.F., Furio, A.M., Brusco, L.I., 2012. Therapeutic application of melatonin in mild cognitive impairment. *Am. J. Neurodegener. Dis.* 1, 280-291.

Clay, E., Falissard, B., Moore, N., Toumi, M., 2013. Contribution of prolonged-release melatonin and anti-benzodiazepine campaigns to the reduction of benzodiazepine and Z-drugs consumption in nine European countries. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 69, 1-10.

Dagan, Y., Zisapel, N., Nof, D., Laudon, M., Atsmon, J., 1997. Rapid reversal of tolerance to benzodiazepine hypnotics by treatment with oral melatonin: a case report. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 7, 157-160.

- Dubocovich, M.L., Delagrange, P., Krause, D.N., Sugden, D., Cardinali, D.P., Olcese, J., 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol. Rev* 62, 343-380.
- Fainstein, I., Bonetto, A., Brusco, L.I., Cardinali, D.P., 1997. Effects of melatonin in elderly patients with sleep disturbance. A pilot study. *Curr Ther Res* 58, 990-1000.
- Ferracioli-Oda, E., Qawasmi, A., Bloch, M.H., 2013. Meta-analysis: melatonin for the treatment of primary sleep disorders. *PLoS One*. 8, e63773.
- Furio, A.M., Brusco, L.I., Cardinali, D.P., 2007. Possible therapeutic value of melatonin in mild cognitive impairment: a retrospective study. *J. Pineal Res.* 43, 404-409.
- Garfinkel, D., Zisapel, N., Wainstein, J., Laudon, M., 1999. Facilitation of benzodiazepine discontinuation by melatonin: a new clinical approach. *Arch. Intern. Med.* 159, 2456-2460.
- Golombek, D.A., Escolar, E., Burin, L., De Brito Sanchez, M., Fernandez, D., Duque, D., Cardinali, D.P., 1992. Chronopharmacology of melatonin: inhibition by benzodiazepine antagonism. *Chronobiology International* 9, 124-131.
- Golombek, D.A., Martini, M., Cardinali, D.P., 1993. Melatonin as an anxiolytic in rats: Time-dependence and interaction with the central gabaergic system. *European Journal of Pharmacology* 237, 231-236.
- Golombek, D.A., Pevet, P., Cardinali, D.P., 1996. Melatonin effect on behavior: Possible mediation by the central GABAergic system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20, 403-412.
- Hajak, G., Lemme, K., Zisapel, N., 2015. Lasting treatment effects in a postmarketing surveillance study of prolonged-release melatonin. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 30, 36-42.
- Hardeland, R., Cardinali, D.P., Srinivasan, V., Spence, D.W., Brown, G.M., Pandi-Perumal, S.R., 2011. Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog. Neurobiol.* 93, 350-384.
- Kunz, D., Bineau, S., Maman, K., Milea, D., Toumi, M., 2012. Benzodiazepine discontinuation with prolonged-release melatonin: hints from a German longitudinal prescription database. *Expert Opin. Pharmacother.* 13, 9-16.
- Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H., Mori, N., 1958. Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 80, 2587.
- Lerner, A.B., Nordlund, J.J., 1978. Melatonin: clinical pharmacology. *J. Neural Transm. Suppl* 339-347.
- Lewy, A.J., Emens, J., Jackman, A., Yuhas, K., 2006. Circadian uses of melatonin in humans. *Chronobiol. Int* 23, 403-412.
- Mandrioli, R., Mercolini, L., Raggi, M.A., 2010. Metabolism of benzodiazepine and non-benzodiazepine anxiolytic-hypnotic drugs: an analytical point of view. *Curr. Drug Metab* 11, 815-829.
- Moore, R.Y., Speh, J.C., 1993. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci. Lett.* 150, 112-116.
- Morin, A.K., Willett, K., 2009. The role of eszopiclone in the treatment of insomnia. *Adv. Ther.* 26, 500-518.
- Pandi-Perumal, S.R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D.W., Maestroni, G.J.M., Zisapel, N., Cardinali, D.P., 2008. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progr. Neurobiol.* 185, 335-353.
- Reiter, R.J., 1983. The pineal gland: an intermediary between the environment and the endocrine system. *Psychoneuroendocrinology* 8, 31-40.
- Rosenstein, R.E., Cardinali, D.P., 1986. Melatonin increases in vivo GABA accumulation in rat hypothalamus, cerebellum, cerebral cortex and pineal gland. *Brain Res.* 398, 403-406.
- Rosenstein, R.E., Cardinali, D.P., 1990. Central gabaergic mechanisms as targets for melatonin activity in brain. *Neurochem. Int.* 17, 373-379.
- Siegrist, C., Benedetti, C., Orlando, A., Beltran, J.M., Tuchscher, L., Nosedá, C.M., Brusco, L.I., Cardinali, D.P., 2001. Lack of changes in serum prolactin, FSH, TSH, and estradiol after melatonin treatment in doses that improve sleep and reduce benzodiazepine consumption in sleep-disturbed, middle-aged, and elderly patients. *J. Pineal Res.* 30, 34-42.
- Vacas, M.I., Cardinali, D.P., 1979. Diurnal changes in melatonin

binding sites of hamster and rat brains. Correlations with neuroendocrine responsiveness to melatonin. *Neurosci. Lett.* 15, 259-263.

Wilson, S.J., Nutt, D.J., Alford, C., Argyropoulos, S.V., Baldwin, D.S., Bateson, A.N., Britton, T.C., Crowe, C., Dijk, D.J., Espie, C.A.,

Gringras, P., Hajak, G., Idzikowski, C., Krystal, A.D., Nash, J.R., Selsick, H., Sharpley, A.L., Wade, A.G., 2010. British Association for Psychopharmacology consensus statement on evidence-based treatment of insomnia, parasomnias and circadian rhythm disorders. *J Psychopharmacol.* 24, 1577-1601.

Winkler, A., Auer, C., Doering, B.K., Rief, W., 2014. Drug treatment of primary insomnia: a meta-analysis of polysomnographic randomized controlled trials. *CNS. Drugs* 28, 799-816.