

REVISIÓN

EL RELOJ BIOLÓGICO, LA HORA DE LA CENA Y LA SIESTA EN ESPAÑA. SU IMPACTO EN LA LONGEVIDAD

THE BIOLOGICAL CLOCK, THE DINNER HOUR AND THE NAP IN SPAIN. ITS IMPACT ON LONGEVITY

Arturo Fernández-Cruz Pérez¹; Rafael Gabriel Sánchez²

¹Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina de España - Medicina Social Catedrático Emérito de Medicina. Universidad Complutense. Hospital Clínico de San Carlos

²Profesor del Departamento de Salud Internacional. Escuela Nacional de Sanidad. Instituto de Salud Carlos III, Madrid

Palabras Clave:

Reloj Biológico;
Regulación;
Genética;
Longevidad.

Keywords:

Biologic Clock;
Regulation;
Genetics;
Longevity.

Resumen

Nuestras vidas transcurren dentro de una serie de ritmos crono-biológicos que adapta nuestra fisiología a diferentes fases del día. El más básico es el conocido como vigilia sueño. Los ritmos circadianos serían la forma anticipativa de nuestra biología para ajustar nuestro ritmo biológico al día y la noche. Pero la investigación científica ha sido capaz de descubrir que este mecanismo de oscilaciones circadianas es responsable de otras regulaciones, como el hambre, humor, estrés, función cardíaca o inmunidad que van más allá que el ritmo del sueño. Las investigaciones más recientes apuntan a que la crono-disrupción puede estar involucrada en el desarrollo de enfermedades crónicas como las cardio-metabólicas, neurodegenerativas y el cáncer. El concepto de reloj central localizado en el núcleo supra-quiasmático en conexión con los relojes periféricos y controlados por genes sensibles a la luz, es el nuevo paradigma. Prestar atención a los biorritmos importa; por lo que independiente de nuestros genes, los estilos de vida pueden modificar en forma disruptiva el ritmo cronobiológico que repercute de forma importante en nuestra salud y en el sentimiento de bienestar. Nuestras horas de comer pueden defendernos o estimular los malos genes responsables de las enfermedades crónicas.

Abstract

Our lives take place within a series of chrono-biological rhythms that adapt our physiology to different phases of the day. The most basic is the one known as sleep wakefulness. Circadian rhythms would be the anticipatory form of our biology to adjust our biological rhythm to day and night. But scientific research has been able to discover that this mechanism of circadian oscillations is responsible for other regulations, such as hunger, mood, stress, cardiac function or immunity that go beyond the rhythm of sleep. The most recent research suggests that chrono-disruption may be involved in the development of chronic diseases such as cardio-metabolic, neurodegenerative and cancer. The concept of central clock located in the supra-chiasmatic nucleus in connection with peripheral clocks and controlled by light-sensitive genes, is the new paradigm. Paying attention to biorhythms matters. Therefore, independent of our genes, lifestyles can change the chrono-biological rhythm in a disruptive way that has an important impact on our health and on the feeling of well-being. Our hours of eating can defend or stimulate the bad genes responsible for chronic diseases.

INTRODUCCIÓN

El 22 de junio del 2018 antes del solsticio de verano, hemos conocido que el presidente norteamericano Donald Trump tomó una decisión inhumana. Nos referimos a la separación de los niños inmigrantes de sus padres en la frontera Mexicano-Americana. El presidente de la Asociación Americana de Pediatría define este hecho como una forma de abuso a los niños por los efectos a largo plazo de esta medida sobre los 2.300 cerebros de estos niños en fase de desarrollo. El arti-

culo "Housing Immigrant Children - The Inhumanity of Constant Illumination" publicado en el NEJM del 22 de junio (1), menciona que el lugar en el que están confinados los niños en McAllen, Texas, está sometido a iluminación con luz artificial durante todo el día. Se trata de una situación crítica para la salud de estos niños, a los que se debería permitir que pudieran dormir cada noche en la oscuridad y ser expuestos de día a la luz natural del exterior. La exposición continuada a la luz artificial no solo interfiere con su ritmo del sueño tan necesario en el periodo de desarrollo, sino que afecta también a los ritmos circadianos maneja-

Autor para la correspondencia

Arturo Fernández-Cruz Pérez
Real Academia Nacional de Medicina de España
C/ Arrieta, 12 · 28013 Madrid

dos por el reloj biológico. La exposición de la retina a la luz de forma periódica (ciclo luz-oscuridad) define este hecho singular.

La evidencia científica sostiene que las alteraciones del ritmo circadiano en estadios que denominamos críticos del desarrollo se asocian con efectos adversos a largo plazo, tales como el desarrollo de obesidad años después e inclusive décadas, tras ser sometidos a esta alteración del ritmo circadiano mencionado (2). Investigadores holandeses han demostrado que en los mamíferos su exposición constante a la luz produce pérdida de masa y fuerza muscular, además de signos incipientes de osteoporosis en la trabécula del hueso. La luz produce además inflamación subclínica y alteraciones del metabolismo de la glucosa, con descenso de los valores de hemoglobina, hematocrito, recuento de hematíes y de leucocitos. (3)

Los niños y los adolescentes necesitan más horas de sueño que los adultos. (4) Los datos publicados por Redline (5) muestran un aumento de hasta el 150% del riesgo de padecer hipertensión en los adolescentes que duermen menos de 6.5 horas por la noche y de un 250% cuando el sueño nocturno se interrumpe más de un 15% del tiempo. Se han publicado también datos que relacionan la exacerbación de los procesos asmáticos y el retraso del crecimiento mediado por la disminución de la liberación de hormona de crecimiento relacionada con el sueño. Se sabe también que el proceso de memorizar y aprender se ve alterado en relación con las alteraciones del ritmo circadiano. La afectación de la amígdala provocada por privación del sueño es responsable de varios trastornos de la conducta como la hiperactividad, el aumento de agresividad con dificultad de controlar las emociones y el déficit de atención. Así lo confirma la revisión de Winsler et al, realizada sobre 28.000 estudiantes de educación secundaria y bachillerato de Virginia, que apunta a que la reducción de las horas de sueño se asocia con un aumento de trastornos mentales y de conducta. (6)

Durante la primera semana de junio de 2018, veintitrés niños tailandeses de 11 a 16 años se quedaron atrapados con su monitor durante 17 días en una cueva del norte de Tailandia. En esta circunstancia se hace aún más patente el estrés psicológico producido por el pánico, el ayuno, la falta de sueño prolongado y el trauma de la separación familiar.

COMENTARIOS

Como concepto básico deberíamos entender en palabras del Nobel Michael W. Young que somos portadores de muchos relojes biológicos en nuestras células, denominados relojes periféricos (ojos, cerebro, hígado, músculos, páncreas, etc.). Estos relojes identifican señales de nuestro entorno para constatar qué hora del día es y actuar en consecuencia. La cartografía cerebral ha localizado en el núcleo supra-quiasmático la región responsable de regular estas funciones, el que sería el reloj central o “*master clock*”. Con elegantes experimentos utilizando la glucosa marcada (sustrato de la actividad metabólica de

la célula) evidenciaron como esta zona se ilumina más durante el día, al aumentar la captación de glucosa radioactiva asociada a actividad metabólica y en cambio sólo a trazos por la noche. El concepto más novedoso es que en los mamíferos todo este mecanismo está regulado por una serie de genes responsables de los ritmos circadianos celulares y del comportamiento en relación con el ritmo circadiano.

Es fascinante identificar que las conductas repetitivas que denominamos ritmos circadianos están codificadas por cientos de genes. Experimentos realizados en la mosca “*drosophila megalonaster*”, han localizado dichos genes en el cromosoma X, donde se detectan las mutaciones que afectan a los trastornos del comportamiento inducidos por el ritmo circadiano. (7)

Parecen ser dos los genes fundamentales: “*period*” (“*per*”) relacionado con los fenotipos circadianos (7) y “*timeless*” (“*tim*”) (8,9), que aunque no asociado con la ritmicidad, al unirse a *period* mediante factores de transcripción permite su emigración al núcleo y la activación de la síntesis de proteínas implicadas en el ritmo circadiano celular. Young descubrió otra pieza de este intrincado sistema: la enzima kinasa denominada “*doubletime*”, que degrada al gen “*per*” fosforilándolo en residuos de serina en ausencia de luz, pero que no actúa si existe la unión de ambos genes “*per*” - “*tim*”. Las mutaciones de estos genes impiden la expresión de la ritmicidad. (10, 11). El Dr. Young descubrió también en 1998 las mutaciones del “*doubletime*” como responsables de un trastorno del sueño en la mosca. La diferencia con el reloj biológico de la mosca radica en que el humano en lugar de ejercer su acción sobre la unión de “*per*” y “*timeless*”, regula la unión de “*per*” con el factor de transcripción criptocromo-1, permitiéndole emigrar al núcleo para ejercer su acción. (12) El insomnio nocturno del llamado síndrome “*familiar advance sleep face*” caracterizado por un retraso en conciliar el sueño asociado a dificultades para despertar en la mañana, o el denominado “*delay sleep fase disorder*” es debido a la alteración-mutación en el gen del criptocromo 1. Se trata de un gen dominante en su forma heterocigótica del que 1 de cada 75 europeos somos portadores y que en ocasiones se expresa simplemente como una somnolencia excesiva y espontánea durante el día.

Un 10% de los españoles sufre algún trastorno del sueño, crónico grave y se estima que entre un 20-48% tiene alguna dificultad para iniciar o mantener el sueño (sueño interrumpido); tres de cada 10 se despiertan con la sensación de no haber descansado bien y esta se mantiene durante todo el día.

Una nueva investigación publicada en Febrero de este año por el Massachusetts General Hospital de Boston acaba de identificar mediante la técnica de aleatorización mendeliana 57 regiones genéticas nuevas o “*loci*” asociadas con trastornos del sueño. El estudio se realizó en 450.000 personas participantes en el proyecto UK-Biobank, de los que un tercio tenía trastornos del sueño. Estos hallazgos se han confirmado en 15.000 nuevos participantes noruegos y en 2.200 sujetos de la base de datos del propio hospital MGH’s Partners Biobank. Estos investigadores encuentran además que

los lugares genéticos mencionados asociados con el insomnio se relacionan con un riesgo doblemente aumentado de padecer enfermedades cardiovasculares y depresión (13,14)

La realidad es que no necesitamos entrar en las posibles alteraciones del lenguaje genético heredado (mutaciones) para explicar las alteraciones que a través de nuestra conducta tomamos voluntariamente en relación con el día y la noche. Es decir, podemos crear confusión en esta maquinaria biótica, al exponer nuestro cuerpo a señales distintas de las programadas. Esto puede ilustrarse con un ejemplo sencillo fácil de entender: el cerebro responde a la luz cuando salgo por la mañana y vuelvo por la noche, mis ojos y mi cerebro, saben que estoy en Madrid. Sin embargo si empiezo a comer a medianoche mi hígado creerá que estoy en Tokio. Esto puede crear un conflicto entre relojes internos creando una situación incoherente que es la de un mismo cuerpo viviendo simultáneamente en dos zonas horarias. La conclusión obvia es que tenemos los relojes diseñados para funcionar correctamente de forma sincrónica y su falta la pagamos con un deterioro de la salud. Como ya hemos mencionado la falta de horas de sueño se asocia a trastornos metabólicos, con un acortamiento en la esperanza de vida. En modelos experimentales en ratones se ha comprobado que cuando deliberadamente se altera el ritmo del reloj del páncreas y del hígado el resultado es la expresión de los genes que expresan el fenotipo diabético y por lo tanto de la enfermedad. Estamos programados para la ritmicidad y romperla no solo es un error sino que puede acarrear la expresión de enfermedades. Cada vez somos más conscientes de la importancia que tiene el ritmo circadiano en la fisiología del músculo y sus reflejos en el rendimiento de los deportistas de élite. Existen un gran número de artículos que muestran que el mejor aprovechamiento de los atletas se obtiene al mediodía y por la tarde.

Recientemente se ha especulado con el dato de los hábitos de los españoles en referencia a la hora de cenar y acostarse. Los datos apuntan a una mayor prevalencia de cáncer de mama en la mujer y de próstata en el hombre. En el estudio publicado en el *International Journal of Cancer* se concluye que la hora de comer importa. En el marco del proyecto MCC-Spain se evaluaron 621 casos de cáncer prostático y 1.205 de mama. Los resultados de las respuestas a cuestionarios de horarios de comidas y sueño que definen el cronotipo, así como de los hábitos alimentarios, apuntan a que las personas que cenar antes de las 9 de la noche y esperan dos horas para ir a dormir, disminuyen un 20% su riesgo de padecer estos tumores. La conclusión sería que un rasgo tan característico de nuestras costumbres horarias podría no ser tan saludable, pudiendo ser considerado hasta cierto punto como una “crono-disrupción”. (15)

El concepto del reloj biológico pasa también por la capacidad de orientarnos. El profesor Young llamaba la atención sobre esta habilidad también controlada por los genes en las antenas de las mariposas, lo que las permiten migrar. La lesión de esos códigos la impiden orientarse. La versión del “GPS humano” está por descubrirse pero estamos convencidos que será pronto descubierto y un hallazgo fascinante.

Los trastornos del sueño han pasado de ser un mero síntoma a constituir un factor de riesgo. Su relación con enfermedades degenerativas tipo Alzheimer o Parkinson son cada vez más sólidas y por ello es razonable pensar en la prevención de estas enfermedades si le prestamos atención a los trastornos del sueño para corregirlos. La conducta del ser humano es neuroquímica, en base a una codificación genética con ritmo de reloj biológico. La práctica médica nos enseña que la preocupación por no poder dormir por la noche claramente afecta a la actividad cotidiana y al trabajo diurno de los sujetos que sufren insomnio crónico. No hay nada erróneo en este saber popular, ya que lo que denominamos sueño reparador no debe interpretarse como perder el tiempo, sino muy al contrario. Nuestro cerebro permanece activo durante las horas de sueño y por ende se desarrollan importantes funciones inmunes, endocrinas y de memoria que contribuyen a nuestro equilibrio metabólico. Es poco conocido que nuestro sistema linfático es más activo durante las fases del sueño que de vigilia.

El otro hábito, el de la siesta, ciertamente controvertido, pone también encima de la mesa que la duración de la misma puede no ser saludable y asociarse con el desarrollo de eventos cardiovasculares en aquellos que padecen enfermedad arterioesclerótica subclínica. (16)

Las nuevas tecnologías ofrecen aplicaciones digitales en nuestros teléfonos móviles que ayudan mediante terapia cognitiva conductual a combatir el insomnio de forma personalizada. Nuestro consejo es que si sufre de este trastorno, el primer paso, antes de iniciar un tratamiento con psicofármacos, debe ser el adoptar buenos hábitos en nuestro entorno. Es evidente que aparte del insomnio existen otros procesos como el síndrome de las piernas inquietas o el de apnea-hipopnea, que afectan hasta un 5% de la población, o la narcolepsia que requieren diagnósticos de precisión y tratamiento específico. La Sociedad Española del Sueño estima que el 90% de los que sufren el síndrome de piernas inquietas o apnea-hipopnea están sin diagnosticar y la cifra estimada para la narcolepsia es del 60%. La muerte por insomnio en aquellos que sufren el “insomnio familiar fatal” es una preocupación creciente, dado que se estima que España concentra cerca de la mitad de los casos a nivel mundial. Se trata de una mutación en el gen D178N que da lugar a síntomas de insomnio crónico y una degeneración cerebral imparable que de forma rápida te lleva a la muerte (17)

Estamos programados para la ritmicidad y esto afecta también a nuestros ritmos circadianos que regulan nuestro control de la saciedad y su impacto en el sobrepeso y obesidad. Existe una evidencia acumulada que señala la necesidad de dormir al menos 7 horas para controlar la obesidad. Recientemente en la revista JACC se han publicado parte de los resultados del estudio PESA-CNIC realizado en 4.000 trabajadores del Banco de Santander. En este artículo se destaca que los que duermen menos de 6 horas tienen un riesgo mayor de que sus vasos envejecen prematuramente con la aparición de enfermedad arterioesclerosa subclínica que se manifiesta con la aparición de placas de colesterol en el árbol arterial. Entre los comentarios que este trabajo han generado está el que la ca-

lidad del sueño también importa. Nos referimos a que la superficialidad del sueño o sueño interrumpido se asocia también con aumento del riesgo de padecer o sufrir arterioesclerosis. (18). También en Febrero de este año, la revista Nature ha publicado un nuevo descubrimiento realizado por el Hospital General de Massachussets de la Universidad de Harvard que da luz a estos hechos. La identificación de una hormona cerebral, llamada hipocretina que controla la producción de células inflamatorias en la médula ósea. En opinión de Filip Swirski la clave de este nuevo hallazgo es que "este mecanismo antiinflamatorio está regulado por el sueño y se descompone cuando interrumpes el sueño con frecuencia o experimentas una mala calidad del mismo". Los científicos se centraron en un grupo de ratones que fueron diseñados genéticamente para desarrollar aterosclerosis. Interrumpieron los patrones de sueño de la mitad de los roedores y permitieron que la otra mitad durmiera normalmente.

Con el tiempo, los ratones con sueño interrumpido desarrollaron lesiones arteriales progresivamente más graves en comparación con los otros roedores.

Específicamente, los ratones con trastornos del sueño desarrollaron placas arteriales o depósitos de grasa, que alcanzaban a ser un tercio más grandes que los animales con patrones de sueño normales.

Los ratones con trastornos del sueño aumentaron también más del doble los niveles de ciertos marcadores inflamatorios en su sistema circulatorio que los roedores control y generaron menores cantidades de hipocretina, la hormona producida por el cerebro que se cree que desempeña un papel clave en la regulación del sueño y estados de vigilia.

Los investigadores mostraron como prueba de concepto que los ratones ateroscleróticos con deficiencia de sueño que recibieron suplementos de hipocretina tendían a producir menos células inflamatorias y desarrollar lesiones ateroscleróticas más pequeñas en comparación con los ratones que no recibieron la suplementación. Estos resultados, demuestran que la pérdida de hipocretina durante el sueño interrumpido contribuye a la inflamación y la aterosclerosis (13).

Para terminar nos gustaría comentar otra prueba de concepto recientemente publicada en Enero de 2019 en el National Science Review. Se trata del uso de la edición genética "tijeras genéticas" sobre los fibroblastos de macacos que expresan una deficiencia en el gen BMAL1 (19). Esta proteína es considerada responsable de regular los genes del ritmo circadiano y del metabolismo, que está además relacionado con la susceptibilidad de padecer enfermedades crónicas como la hipertensión, la obesidad y la diabetes. En el trabajo se describe que estos animales presentan un sueño corto, es decir una crono-disrupción con derivación del sueño, que se manifestaba como trastornos psicopatológicos, ansiedad, depresión y alteraciones en la liberación rítmica de las hormonas neuroendocrinas con modificaciones en la respuesta al estrés, así como con aumento de citoquinas inflamatorias que aceleran su envejecimiento.

Como punto final viene a la memoria la historia reciente de un paciente de 92 años, destacado empresario, afectado por una insuficiencia cardiaca con función sistólica preservada y que a pesar de haber tenido siempre una actitud vital mental positiva, consultaba por el insomnio que le aflige debido "al miedo a no despertar". En este contexto y sin querer desvirtuar al maestro D. Gregorio Marañón y Posadillo quien definía con brillantez que "Vivir no es solo existir, sino existir y crear, saber gozar y sufrir y no dormir sin soñar. Descansar, es empezar a morir". Su mensaje fue destacar que la vida es demasiado breve para que nos la pasemos descansando. Sin embargo consideramos que estamos viviendo una transición hacia una esperanza de vida entre 150 y 200 años con un objetivo muy claro, que es no solo rejuvenecer, que también, sino que seamos capaces de alcanzar la longevidad de una forma saludable, en la que el sueño reparador importa y mucho.

CONCLUSIÓN

La complejidad de la biología y de la vida misma, nos desafían cada día a explicar evidencias y realidades que aún no sabemos explicar y que torpemente podrían ser consideradas contradictorias. A pesar de nuestros poco saludables y recomendables hábitos horarios, España fue en 2018 el país más saludable del mundo, según el último informe *the Bloomberg Healthiest Country* (20), que nos otorga una puntuación de 93 sobre 100, habiendo desbancado a Italia del primer puesto en 2017. Dicho informe destaca que este resultado puede deberse entre otros a la calidad del sistema sanitario público, especialmente la atención primaria, pero también a los beneficios para la salud de nuestra dieta y estilo de vida mediterráneo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Czeisler CA. Housing Immigrant Children: The Inhumanity of Constant Illumination. *N Engl J Med* 2018 July; 379(2): e3.
2. Beccuti G, Pannain S. Sleep and obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011; 14: 402-412.
3. Spoelstra K, Van Grunsven RH, Donners M et al. Experimental illumination of natural habitat: an experimental set-up to assess the direct and indirect ecological consequences of artificial light of different spectral composition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015; 370(1667). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0129>
4. Wolfson AR, Spaulding NL, Dandrow C, Baroni EM. Middle school start times: The importance of a good night's sleep for young adolescents. *Behav Sleep Med* 2007; 5: 194-209.
5. Javaheri S, Storfer-Isser A, Rosen CL, Redline S. Sleep quality and elevated blood pressure in adolescents. *Circulation* 2008; 118:1034-1040.
6. Winsler A, Deutsch A, Vorona RD, Payne PA, Szklo-Coxe M. Sleepless in Fairfax: The difference one more hour of sleep can make for teen hope-

- lessness, suicidal ideation, and substance use. *J Youth Adolesc* 2015; 44: 362-378.
7. Bargiello TA, Jackson FR, Young MW. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *drosophila*. *Nature* 1984; 312: 752-754.
 8. Myers MP, Wager-Smith K, Rothenfluh-Hilfiker A, Young MW. Light-induced degradation of TIMELESS and entrainment of the *drosophila* circadian clock. *Science* 1996; 271: 1736-1740.
 9. Choogon L, Parikh V, Itsukaichi T, Bae K, Edey I. Resetting the *drosophila* clock by photic regulation of PER and a PER-TIM complex. *Science* 1996; 271(5256): 1740-1744.
 10. Brian K, Price JL, Saez L et al. The *drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase I ϵ . *Cell* 1998; 94: 97-107.
 11. Axelrod S, Saez L, Young MW. Studying circadian rhythm and sleep using genetic screens in *drosophila*. *Methods Enzymol* 2015; 551: 3-27.
 12. Patke A, Murphy PJ, Onat OE et al. Mutation of the human circadian clock gene CRY1 in familial delayed sleep phase disorder. *Cell* 2017; 169: 203-215.
 13. McAlpine CS, Kiss MG, Rattik S et al. Sleep modulates haematopoiesis and protects against atherosclerosis. *Nature* 2019; 566: 383-387.
 14. Lane JM, Jones SE, Dashti HS et al. Biological and clinical insights from genetics of insomnia symptoms. *Nat Genet* 2019; 51: 387-393.
 15. Kogevinas M, Espinosa A, Castelló A et al. Effect of mistimed eating patterns on breast and prostate cancer risk (MCC-Spain Study). *Int J Cancer* 2018; 143: 2380-2389.
 16. Wijnen H, Young MW. The Right period for a Siesta. *Neuron* 2008; 60: 943-946.
 17. Stevens JM, Levine MR, Constantino AE, Motamedi GK. Case of fatal familial insomnia caused by D178N mutation with phenotypic similarity with Hasihmoto's encephalopathy. *BMJ Case Rep* 2018.
 18. Domínguez F, Fuster V, Fernández-Alvira JM et al. Association of Sleep Duration and Quality with Subclinical Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2019; 73: 134-144.
 19. Peiyuan Q, Jian J, Zhen L et al. BMAL1 knockout macaque monkeys display reduced sleep and psychiatric disorders. *Natl Sci Rev* 2019; 6: 87-100.
 20. Miller LJ, Lu W. These are the world's healthiest nations. <https://www.bloomberg.com/news/articles/2019-02-24/spain-tops-italy-as-world-s-healthiest-nation-while-u-s-slips>

DECLARACIÓN DE TRANSPARENCIA

El autor/a de este artículo declara no tener ningún tipo de conflicto de intereses respecto a lo expuesto en la presente revisión.

Si desea citar nuestro artículo:

Fernández-Cruz. A.

El reloj biológico. Su impacto en la longevidad

ANALES RANM [Internet]. Real Academia Nacional de Medicina de España;

An RANM · Año 2019 · número 136 (02) · páginas 201–205

DOI: 10.32440/ar.2019.136.02.rev14