

UNIVERSIDAD DE NAVARRA. FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES MEDICAS, C. S. I. C.

Alteraciones de la inmunidad humoral asociadas al envejecimiento*

M. Pérez Miranda

RESUMEN

En el presente trabajo hemos estudiado los cambios que experimentan diversos factores de la inmunidad humoral durante el proceso del envejecimiento. Por una parte, hemos valorado el proteinograma, el análisis inmunolectroforético y la determinación cuantitativa de inmunoglobulinas en 10 personas jóvenes normales y en 46 de edades comprendidas entre los 65 y 90 años. Por otra parte, hemos analizado la distribución, por grupos de edad, de las positivities resultantes en las determinaciones de antiestrep-tolisina O (139 casos), proteína C reactiva (142 casos), factor reumatoide (162 casos) y fenómeno L E (87 casos). Los cambios encontrados en el patrón protéico consisten en hipoalbuminemia e hipergammaglobulinemia intensas y progresivas con la edad, acompañadas de un aumento más o menos marcado de las alfa-globulinas y de las beta-1-globulinas. El análisis inmunolectroforético de las subfracciones de estos grupos protéicos ha revelado un incremento más acentuado de la alfa-2-ceruloplasmina y de la alfa-2-macroglobulina, así como de las beta-lipoproteínas; estos incrementos se han acompañado de normalidad o ligera disminución de la alfa-1-antitripsina y de la transferrina. Asimismo, han sido identificadas también modificaciones cualitativas, de carácter paraproteinémico, en el grupo de las inmunoglobulinas. La determinación cuantitativa de inmunoglobulinas ha objetivado un incremento homogéneo de las mismas, del orden del 100 %. El título de antiestrep-tolisinas ha experimentado un descenso rápidamente decreciente a lo largo de los distintos grupos de edad,

(*) Parte de los resultados contenidos en este trabajo han sido presentados en la conferencia dictada por el autor en el Curso de Geriatria organizado por el Dr. F. Flórez

Tascón (Madrid, 1970), y en la Reunión de la Sociedad Española de Gerontología (Soria, 1970).

hasta llegar a desaparecer en el de edad más avanzada. Por el contrario, el comportamiento de los auto-anticuerpos investigado ha sido inverso, aumentando gradualmente con la edad, salvo en la edad media de la vida, en la que se ha encontrado la mayor incidencia de positividad. Se ha podido comprobar, por tanto, una exaltación de la respuesta inmunitaria humoral, tanto específica (autoanticuerpos), como inespecífica (incremento de proteína C reactiva). Esta exaltación de la respuesta inmunitaria es debida a la mayor actividad de los mecanismos de respuesta frente a las sustancias anormales del propio organismo (función auto-inmune), mientras que la respuesta frente al estreptococo (función isoimmune) está notoriamente disminuida. Se han discutido estos resultados, interpretándolos a la luz de los conocimientos actuales sobre los mecanismos inmunológicos, tanto homeostáticos como de defensa. Se señala el indudable papel que estas alteraciones de la inmunidad humoral desempeñan en el proceso del envejecimiento, a cuyo mecanismo contribuyen, sin que, al parecer, constituyan un factor desencadenante.

No es necesario señalar el interés, siempre renovado, que el estudio de la biología del envejecimiento encierra, ya que este proceso está condicionado por las profundas motivaciones biológicas que determinan el promedio de vida de las especies. A lo largo del tiempo se han sucedido numerosas teorías que han tratado de comprender, con sentido biológico, el proceso del envejecimiento en sí. Con ellas se ha intentado aportar alguna luz sobre los oscuros mecanismos de realización de esta etapa involutiva de la vida. Estudios numerosos realizados en las décadas inmediatamente pasadas han aportado positivos datos experimentales sobre la senectud y sobre los mecanismos del envejecimiento, disponiéndose en la actualidad de un estimable cuerpo de doctrina que se contiene recogido en interesantes monografías publicadas recientemente ^{1, 6, 7, 13, 14, 47, 57, 78, 83, 87 y 91}. Destacan de entre la multitud de hechos parciales, tanto clínicos como bioquímicos y experimentales, una serie de datos que sugieren la posible intervención de mecanismos inmunológicos en el desarrollo del proceso involutivo del envejecimiento. Quizá cabría esperar que en las edades avanzadas se desarrollase la función inmunitaria con menor actividad, al igual que sucede con otras funciones fisiológicas. Pero los hechos que vamos a co-

mentar a continuación no sólo no apoyan este supuesto, sino que más bien indican lo contrario.

Se han comunicado alteraciones morfológicas de algunos de los órganos relacionados con el sistema inmunitario que indican la existencia de modificaciones importantes del mismo en la edad senil. El bazo experimenta un aumento de tamaño en las últimas décadas de la vida, que se acompaña de proliferación de los folículos linfáticos ⁸⁸. En el sistema linfático en general se registra un incremento en el número de células plasmáticas, al mismo tiempo que aumentan los linfocitos en diversos órganos periféricos ^{6, 13 y 88}.

Es conocida la mayor incidencia en la edad senil de un grupo de enfermedades degenerativas en las que interviene, con toda probabilidad, una patogenia autoinmune. Tal es el caso de la arteritis de células gigantes, de admitida génesis hiperérgica, cuya máxima incidencia ocurre a los 68 años de promedio ⁶⁹, así como el de otras poliarteritis de probable etiopatogenia autoinmune ⁷. La amiloidosis, enfermedad eminentemente senil, es considerada actualmente por muchos como prototipo de proceso inmunopatológico ^{50, 52 y 76}. En la génesis de un proceso tan característico de la vejez como es la arteriosclerosis se ha discutido también

recientemente la intervención de un mecanismo inmunitario⁶⁸. La morbilidad de enfermedades autoinmunes como la poliartritis degenerativa, el lupus eritematoso diseminado, la esclerodermia y la miastenia grave sigue una distribución estadística paralela y equivalente a la incidencia de cambios tan característicos de la vejez como la caída de los dientes, el encanecimiento del cabello, la psicosis involutiva, etc.^{8a}.

Los hechos de carácter anatomopatológico y clínico que acabamos de reseñar revelan la existencia de indudables modificaciones del sistema inmunitario en la edad senil. La mayor frecuencia de enfermedades autoinmunes a estas edades y la hiperplasia linfática y plasmocítica que se observa con frecuencia, denuncian una situación inmunitaria anómalamente hiperfuncionante.

Con objeto de valorar y precisar las características de las modificaciones seniles del sistema inmunitario y para tratar de esclarecer la significación que estos cambios tienen en el proceso del envejecimiento, realizamos en el presente trabajo un estudio sistemático de diversos factores de la inmunidad humoral. Desde los clásicos estudios electroforéticos de Tiselius y Kabat^{85 y 86} se sabe que las gamma-globulinas constituyen la fracción plasmática portadora de los anticuerpos específicos. Posteriormente se ha ido conociendo que el papel de defensa inmunitaria inespecífica está desempeñado por una serie de diversas proteínas, distintas a las gamma-globulinas, que se denominan genéricamente "reactantes de fase aguda"⁷⁵ y que pertenecen a distintas fracciones plasmáticas. Para tratar de revelar cambios en la inmunidad humoral es necesario, por tanto, hacer un estudio detallado de los componentes protéicos del plasma. Actualmente es posible realizar un análisis satisfactorio de las proteínas séricas combinando los resultados cuantitativos de la electroforesis en ace-

tato de celulosa⁴⁶ con las posibilidades de caracterización cualitativa que proporciona la inmunoelectroforesis³¹. Por otra parte, la reciente introducción de técnicas inmunoquímicas cuantitativas⁵⁴ permite realizar la valoración individual exacta de cada una de las proteínas. Pero el estudio de los diversos factores protéicos de la inmunidad humoral no es suficiente, por sí solo, para descubrir modificaciones cualitativas de la respuesta inmunitaria. Para objetivar este tipo de alteraciones es necesario un estudio funcional de la capacidad de producción de anticuerpos. Existen diversas posibilidades para explorar la capacidad de producción de anticuerpos. En general se trata de valorar la respuesta frente a la administración de antígenos bacterianos, proteicos o de otro tipo^{72, 82}. No existen diferencias esenciales en el tipo de respuestas frente a uno u otro tipo de antígenos, incluyendo los antígenos bacterianos de las infecciones habituales⁵⁵. Por este motivo, la respuesta frente a una infección como la estreptocócica puede considerarse como prototipo de la respuesta inmunitaria frente a los agentes externos⁵⁵.

La valoración de anomalías de la respuesta inmunitaria de carácter autoagresivo es posible realizarla mediante la investigación de autoanticuerpos. De los múltiples autoanticuerpos que pueden ser determinados en circunstancias diversas, los anticuerpos antigamma-globulina ("factor reumatoide"), los anticuerpos antinucleares ("factor L E") y los anticuerpos antitiroideos han sido los más frecuentemente investigados. Por este motivo se dispone en la actualidad de pruebas standardizadas para su estudio que ofrecen una aceptable garantía para la interpretación de los resultados que con ellas se obtienen^{10, 15, 40 y 82}. La gran sensibilidad que poseen estos métodos de determinación, por otra parte, permite detectar mínimas cantidades de autoanticuerpos, por lo que resultan adecua-

dos para la exploración de pequeñas manifestaciones de carácter autoagresivo.

De acuerdo con lo dicho, y con el objetivo de investigar la existencia de posibles cambios seniles en la inmunidad humoral, realizamos en el presente trabajo un estudio electroforético, inmunoelectroforético e inmunoquímico cuantitativo de la disproteinemia senil. Asimismo, realizamos un estudio simultáneo de la respuesta inmunitaria en la vejez, mediante la determinación de la tasa de proteína C reactiva y de anticuerpos anti-estreptolisina O, como expresivos de la respuesta frente a agentes del exterior, y mediante la investigación de autoanticuerpos anti-nucleares y anti-gamma-globulina, como expresivos de posibles cambios autoagresivos en el tipo de respuesta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Casística

El material objeto del estudio ha sido un conjunto heterogéneo, constituido por dos grupos distintos. El primero de estos grupos está formado por un total de 56 sueros y ha sido el material utilizado para realizar los estudios electroforéticos, inmunoelectroforéticos y los de la determinación inmunoquímica de inmunoglobulinas. 10 de estos 56 sueros pertenecen a personas normales, de edad comprendida entre los 18 y 25 años. Los 46 restantes proceden de personas de edad avanzada que han estado ingresadas recientemente en el Hospital Clínico de la Universidad de Navarra. Se trataba de personas convalecientes de bronquitis crónica o de otros procesos banales, en los que no cabe esperar manifestaciones disproteinémicas. Estos sueros se recogieron inmediatamente antes del alta de los pacientes, cuando los síntomas clínicos habían desaparecido y los datos analíticos se habían normalizado. Complementariamente se comprobó en todos es-

tos casos la normalidad de la función hepática y de los datos hematológicos, así como de la función renal. 3 casos que mostraron pruebas hepáticas ligeramente alteradas, fueron desechados de la casuística. El segundo grupo objeto de nuestro estudio ha sido extraído del material clínico de la Clínica Universitaria de Pamplona. Está constituido por las determinaciones de antiestreptolisina O, proteína C reactiva y factor reumatoide realizadas en los últimos 6 meses en aquellos pacientes en los que había sospecha de positividad para dichas pruebas, así como por las determinaciones del fenómeno LE realizadas en los dos últimos años (*).

Electroforesis simple

La hemos realizado, utilizando como soporte el acetato de celulosa, en cámaras Elphor. La electroforesis y el proceso ulterior de tinción y aclaramiento de las preparaciones se ha realizado siguiendo la técnica preconizada por Kohn⁴⁶, que es la que habitualmente seguimos en nuestro laboratorio^{61, 62, 64 y 65}.

Inmunoelectroforesis

Se ha realizado siguiendo la modificación de Scheidegger⁷³ del método original de Grabar y Williams³¹. Pequeñas modificaciones, relativas al tiempo de la electroforesis y al proceso de lavado y tinción de las preparaciones, han sido comunicadas previamente en varias ocasiones^{61, 62 y 64}.

Como antisuero hemos utilizado inmunosuero de cabra frente a suero humano normal, obtenido de fuente comercial (**).

(*) Agradecemos al Dr. A. López Borrasca, Jefe del Departamento de Hematología y Laboratorios Clínicos, la amable cesión de los archivos correspondientes.

(**) Hyland Lab., Los Angeles, U. S. A.

Determinación cuantitativa de inmunoglobulinas

La hemos realizado siguiendo el método de inmunodifusión radial preconizado por Mancini, Carbonara y Heremans⁵⁴. Para ello hemos utilizado placas "Partigen", que contienen una mezcla de agar con el antisuero monoespecífico correspondiente (*). Las placas rellenas con las respectivas muestras de sueros problema se han dejado incubar durante 72 horas. Cada vez que se utilizaba una placa distinta, se intercalaban dos muestras patrón, de concentración protéica conocida, a los que se referían los resultados de las muestras problema. De este modo, se obviaban errores debidos a posibles diferencias en la concentración de antisuero entre unas placas y otras. Se ha utilizado como patrón "Standard-Serum" de Behringwerke.

Valoración del título de antiestreptolisina O

Se ha hecho mediante incubación de diluciones geométricas del suero problema con una solución de estreptolisina O y una suspensión de eritrocitos. La técnica y pauta de las determinaciones ha sido recomendada por la firma que suministra los reactivos (**).

Demostración de Proteína -C- Reactiva.

Se ha utilizado el método de aglutinación de partículas de latex recubiertas de suero antiproteína-C-reactiva. (***)). Con objeto de evitar la incidencia de falsas reacciones positivas, la lectura se hizo

siempre dentro de los 3 primeros minutos de la prueba.

Reacción para factor reumatoide (F.R.)

Como en el caso de la proteína C reactiva, se ha usado el método de aglutinación de partículas de latex. El reactivo de latex, recubierto en este caso por fracción gamma-globulina humana, ha sido obtenido de la misma fuente comercial (***)). Se tuvieron en cuenta las mismas precauciones técnicas que para la demostración de proteína C reactiva.

Investigación del fenómeno L-E.

Se ha realizado investigando al microscopio óptico la presencia de células L.E. en la preparación obtenida a expensas del coágulo formado tras la incubación de la sangre problema. Se ha seguido el método descrito por Hallmann³⁵.

RESULTADOS

1. Modificaciones del proteinograma

Los resultados obtenidos con los 56 sueros estudiados por electroforesis en acetato de celulosa se reproducen en la Tabla I. En conjunto, la diferencia fundamental que hemos observado, entre los sueros de personas jóvenes y los procedentes de sujetos de edad avanzada, ha consistido en una disminución global de las fracciones anódicas en el grupo senil. Esta disminución se acompaña de un incremento relativo de las fracciones catódicas. El análisis individual de las fracciones pone de manifiesto una disminución, porcentualmente más significativa, de la albúmina, mientras que entre las fracciones que están aumentadas destaca fundamentalmente la gamma-globulina, seguida de la beta-1-globulina. La tasa electroforética de las beta-2-globulinas no se modifica sensiblemente. Se ha podido registrar también un incremento

(*) "Partigen-Immunopattes" de Behringwerke, Marburg/Lahn, Alemania.

(**) B-D Mérieux. Marcy L'étoile (Rhone), Francia.

(***) Hyland Lab. Los Angeles U. S. A.

TABLA I

EDAD	CASOS	TOTAL	PRE.	ALB.	ALFA		BETA		GAMMA	
					1	2	1	2		
18-25	10	gr %	7,08	0,06	3,31	0,34	0,96	0,63	0,44	1,29
		%		0,8	46,0	4,8	13,5	8,8	6,2	18,2
60-75	32	gr %	7,00	0,04	3,00	0,36	0,98	0,69	0,43	1,43
		%		0,5	42,8	5,1	14,0	9,8	6,1	20,4
75-90	14	gr %	7,04	0,08	2,84	0,44	1,04	0,76	0,44	1,60
		%		1,1	39,9	6,2	14,7	10,7	6,2	22,7

senil de las dos fracciones alfa. La proteinemia total prácticamente no se ha modificado en el grupo de edad más avan-

zada, habiéndose registrado solamente una disminución no significativa en el grupo de edad inmediatamente inferior. De la comparación de los valores obtenidos en los dos distintos grupos de personas de edad avanzada, se infiere que las modificaciones del proteinograma que hemos comentado se acentúan con la edad. Esto es particularmente válido para el incremento de las gamma-globulinas y para la disminución de la albúmina. La fracción prealbúmina, que está disminuida en el grupo de 60-75 años, se ha mostrado normal o ligeramente aumentada en el grupo de edad más avanzada.

Además de las modificaciones cuantitativas que hemos comentado, pudimos constatar también alteraciones cualitativas de la morfología de las fracciones. Estas alteraciones consistían en engrosamientos parciales dentro de la gamma-globulina. Su presentación fue ocasional, registrándose únicamente en 4 de los 46 casos estudiados.

2. Cambios en el patrón inmunoelectroforético

El análisis inmunoelectroforético ha podido confirmar y precisar con detalle los hallazgos obtenidos mediante el estudio del proteinograma. Ha suministrado además datos adicionales sobre el comportamiento de cada una de las proteínas de los distintos grupos electroforéticos.

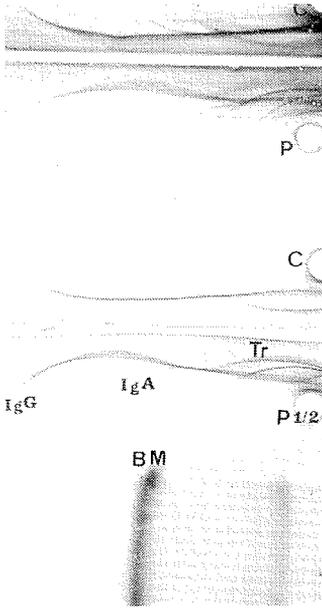


Fig. 1. Análisis inmunoelectroforético de un caso del grupo de 75-90 años (Problema), comparado con un suero normal (Control). Sueros sin diluir en la porción superior y diluidos al 1/2 en la media. En la porción inferior, el proteinograma correspondiente al suero problema, en el que puede apreciarse una banda monoclonal (B. M). Obsérvese el gran aumento de IgA, y también de IgG, en relación con el control, así como la normalidad de la transferrina (Tr).

Las líneas de precipitación correspondientes a la albúmina se han encontrado más o menos débilmente marcadas en el grupo de sujetos de edad avanzada. Las líneas de precipitación de las inmunoglobulinas IgG e IgA se encontraron, por el contrario, expresivamente engrosadas. La IgM precipitó como normal en unos casos. Pero también se la encontró aumentada e incluso muy aumentada en un caso. En este caso se había observado en el proteinograma un engrosamiento, en forma de banda transversal, en la porción inicial de la gamma-globulina, con-

firiéndole este hecho cierto carácter paraproteinémico (fig. 1). Sin embargo, el hallazgo más frecuente en la zona de las inmunoglobulinas ha sido un aumento uniforme y proporcionado de los tres tipos principales (fig. 2).

Prescindiendo del caso, ya citado, en que la IgM mostró carácter paraproteinémico, las alteraciones cualitativas más frecuentes han sido las observadas en el arco de precipitación de la IgG. En 3 de estos casos, las alteraciones coincidieron con la presencia en el proteinograma de bandas transversales de carácter monoclonal,

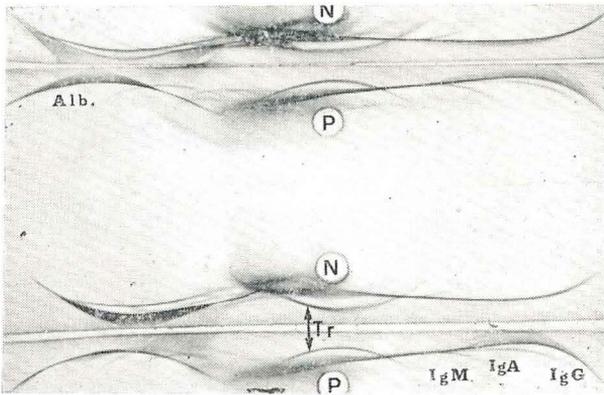
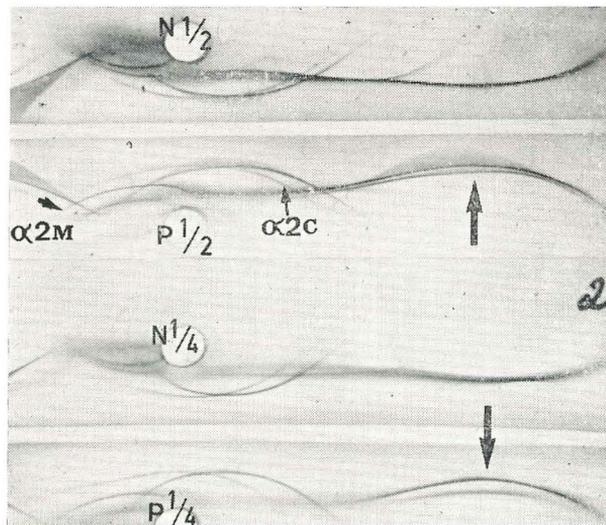


Fig. 2. Aumento global de las inmunoglobulinas en el suero problema. Obsérvese la identidad de la transferrina (Tr) en ambos sueros. En la parte superior, sueros sin diluir; en la inferior, sueros diluidos al 1/2.

Fig. 3. Alteraciones cualitativas de IgG asociadas a la existencia de una banda monoclonal en el proteinograma. Obsérvese cómo a medida que aumenta la dilución del suero problema (P) se hace más evidente la duplicación de la IgG (marcada con flecha gruesa). Tanto la alfa-2-macroglobulina (α -2-M), como la alfa-2-ceruloplasmina (α -2-C) están más intensamente marcadas en el suero problema.



como puede observarse en la fig. 3. En otros 7 casos también pudieron demostrarse alteraciones cualitativas de IgG, sin que hubiera correspondencia con cambios equivalentes en el proteinograma. En estos casos, la alteración cualitativa de la línea de precipitación, consistente en una duplicación asimétrica de la misma, únicamente pudo ponerse de manifiesto al hacer una dilución progresiva del suero. La duplicación se hizo más ostensible a medida que la dilución fue mayor (fig. 4).

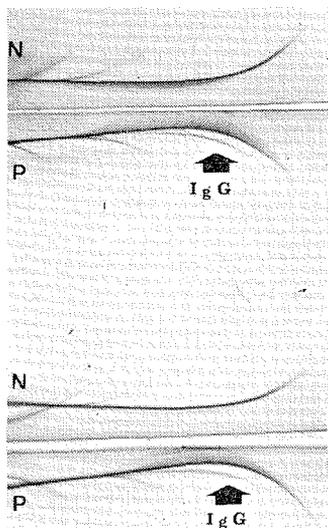


Fig. 4. Anormal duplicación de la IgG en el suero problema, que se acentúa con la progresiva dilución del suero.

Dentro del grupo de las *alfa-globulinas* encontramos un discreto aumento de la alfa-2-ceruloplasmina y un aumento aún menos expresivo de la alfa-2-macroglobulina. Estos aumentos se han acompañado generalmente de normalidad o ligera disminución de la alfa-1-antitripsina (figuras 1 y 3).

En el grupo de las *beta-globulinas* hay que señalar, junto a la normalidad de la transferrina (figs. 1 y 2), el aumento de

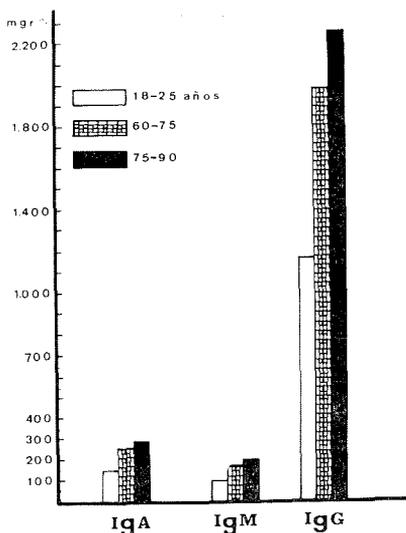


Fig. 5. Representación esquemática del nivel de inmunoglobulinas plasmáticas en cada uno de los tres grupos de edad.

la beta-1-lipoproteína y de la beta-2-glicoproteína.

3. Concentración plasmática de inmunoglobulinas

El nivel plasmático de las tres clases principales de inmunoglobulinas se ha encontrado uniformemente elevado en los dos grupos de sujetos de edad avanzada. Al grupo de mayor edad corresponde una concentración más elevada. Los resultados obtenidos para cada grupo se reproducen en la tabla II. En la fig. 5 se reproduce la representación esquemática de estos resultados. En ella puede observarse cómo los aumentos porcentuales de las tres inmunoglobulinas son semejantes, aunque en valores absolutos el incremento de IgG es de mayor cuantía.

4. Comportamiento de la Proteína-C-Reactiva

De las 142 determinaciones que valoramos en este estudio, ha habido 28 positivities (19,7%). La distribución de las positivities por grupos de edad está recogida en la tabla III. Como queda re-

TABLA II

GRUPO DE EDAD	I g A	I g M	I g G
18 — 25 (n = 10)	154 (±46)	105 (±40)	1.170 (±180)
60 — 75 (n = 32)	264 (±50)	170 (±34)	1.985 (±210)
75 — 90 (n = 14)	286 (±38)	196 (±42)	2.246 (±190)

TABLA III

DETERMINACION

GRUPO DE EDAD	ANTIESTREPTOLISINA			PROTEINA-C-REACTIVA		
	Casos	+	%	Casos	+	%
10 — 20	13	6	46,1	18	2	11,1
20 — 30	21	8	38,0	21	3	14,2
30 — 40	29	9	31,0	24	4	16,6
40 — 50	27	6	22,2	26	5	19,6
50 — 60	28	4	14,2	22	5	22,7
60 — 70	15	1	6,6	19	5	26,3
70 — 80	6	0	0,0	12	4	33,5

presentado en la fig. 6, el procentaje de positividad para la proteína C reactiva se ha ido incrementado sensiblemente a medida que aumentaba la edad del grupo considerado, correspondiendo al grupo de 70-80 años la mayor positividad (33,5 %). Interesa hacer constar que el comportamiento de la proteína C reactiva ha sido, por lo tanto, semejante al de las inmunoglobulinas, es decir ha aumentado sensiblemente con el incremento de la edad.

5. Incidencia de anticuerpos antiestrep-tolisina O

Los anticuerpos antiestrep-tolisina O han seguido un comportamiento exactamente inverso al de la proteína C reactiva y al

de las inmunoglobulinas. Han ido disminuyendo progresivamente hasta llegar a desaparecer por completo en el grupo de edad más avanzada. La incidencia porcentual de estos anticuerpos en cada uno de los 7 grupos de edad considerados se consigna en la tabla III. Puede observarse gráficamente en la fig. 6 la rápida disminución de anticuerpos antiestrep-tolisina O a medida que va aumentando la edad del grupo considerado.

6. Presencia de autoanticuerpos

La presencia de los dos tipos de auto-anticuerpos investigados en los distintos grupos de edad ha sido muy semejante. Como puede observarse en la fig. 7, la incidencia de presentación de estos auto-

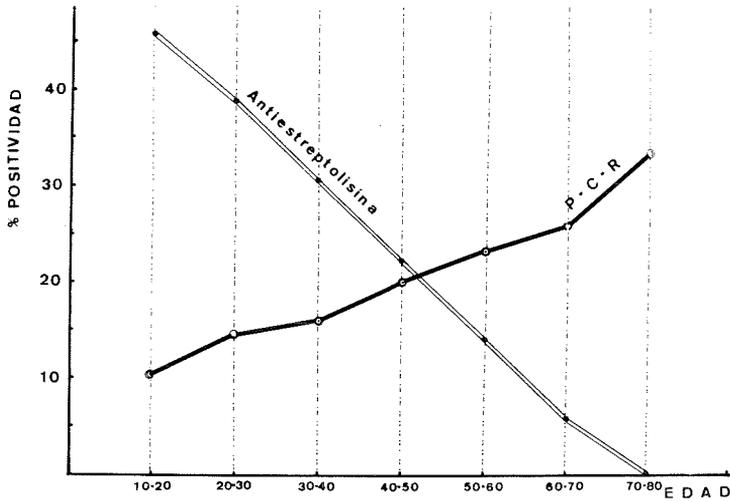


Fig. 6. Procento de positividad de las determinaciones de Proteína C Reactiva (P-C-R) y de Antiestreptolisina O en los distintos grupos de edad.

anticuerpos ha seguido una evolución paralela. En ambos casos ha habido, en conjunto, un incremento progresivo con la edad, aunque la mayor incidencia está, en ambos casos, en el grupo de edad de 40 a 50 años. Tras un descenso inmediatamente después de esta edad, hay un nue-

vo incremento, si bien menos marcado, que persiste hasta los 70-80 años. En la tabla IV se consigna tanto el procento de positividad para anticuerpos anti-gamma-globulina ("factor reumatoide = F.R."), como para anticuerpos antinucleares ("factor LE"). La intensidad con que

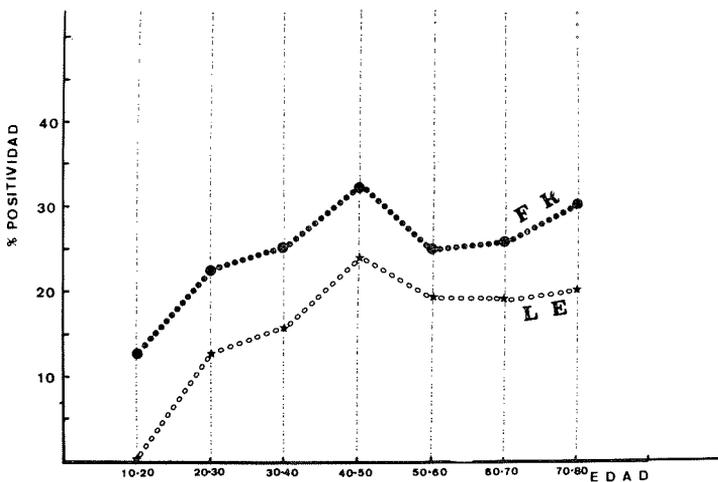


Fig. 7. Procento de positividad de las determinaciones de factor reumatoide (F R) y de factor L E en los distintos grupos de edad.

TABLA IV

DETERMINACION

GRUPO DE EDAD	FENOMENO L E			FACTOR REUMATOIDE		
	Casos	+	%	Casos	+	%
10 — 20	7	0	0	16	2	12,5
20 — 30	8	1	12,5	31	8	22,5
30 — 40	24	4	16,6	24	6	25,0
40 — 50	21	5	23,8	34	11	32,3
50 — 60	16	3	18,7	32	8	25,0
60 — 70	11	2	18,1	15	4	26,6
70 — 80	5	1	20,0	10	3	30,0

han reaccionado los anticuerpos antinucleares ha sido, en general, variable, aunque casi siempre los fenómenos LE más intensos se han obtenido con la sangre de los grupos de 30-40 y 40-50 años. La fig. 8 reproduce una intensa positividad obtenida en un caso del grupo de 30-40 años.

En resumen, los resultados obtenidos se sintetizan en lo siguiente:

Aumento evidente y paralelo a la edad tanto de las inmunoglobulinas o anticuerpos específicos, como de la proteína C reactiva o factor inmunitario inespecífico. Este mayor aumento de factores humorales de la inmunidad se ha acompañado de una disminución de la propia respuesta inmunitaria frente a factores externos (disminución del título de antiestreptolisinas) y de un aumento de los anticuerpos dirigidos frente a substancias del propio organismo o autoanticuerpos (aumento de anticuerpos anti-gamma-globulina y antinucleares).

DISCUSIÓN

Los resultados que hemos descrito anteriormente ponen de manifiesto diferen-

cias muy significativas entre los dos grupos analizados. El comportamiento de los distintos factores de la inmunidad humoral que hemos considerado ha sido muy diferente en la población de edad avanzada, con respecto al grupo de personas jóvenes utilizado como control de referencia.

Aunque el material clínico objeto del estudio ha sido heterogéneo, el criterio que se ha seguido para seleccionarlo proporciona, a nuestro juicio, un muestreo representativo de los dos tipos de poblaciones. Los sueros que hemos utilizado para el proteinograma, para el análisis inmunoelectroforético y para la determinación cuantitativa de inmunoglobulinas procedían de personas jóvenes normales y de sujetos de edad prenil o senil en situación de normalidad clínica y analítica. Como se expuso al describir la casuística, se extremaron los controles en este último grupo. Los casos que ofrecieron alguna duda, aunque fuese poco consistente, no fueron incluidos en el estudio. Es difícil establecer, por otra parte, criterios de normalidad más precisos para esas edades avanzadas. Es prácticamente imposible decidir cuáles de los cambios anatómicos y fisiológicos que

tienen lugar en la vejez son estrictamente involutivos y cuáles corresponden a manifestaciones de carácter patológico⁴⁵.

Para las determinaciones de proteína C reactiva, título de antiestreptolisina O y de autoanticuerpos hemos tenido que recurrir a distintos grupos de pacientes, ya que estas sustancias no son habitualmente demostrables en personas normales. En ciertas circunstancias es posible objetivar reacciones positivas para proteína C reactiva^{28, 63}, antiestreptolisina¹⁷, factor reumatoide⁵⁹ y factor LE^{10, 70} en un bajo porcentaje de personas aparentemente sanas. Pero este bajo porcentaje de presentación imposibilita en la práctica el lograr una distribución de positividad según la edad lo suficientemente numerosa como para poder satisfacer nuestro objetivo con criterio estadístico. Quedan descartados posibles errores imputables a peculiaridades evolutivas del proceso patológico porque se han considerado diversas enfermedades, de características evolutivas distintas. Por las razones que hemos señalado, el material clínico objeto del estudio constituye una muestra representativa que nos permite afirmar conclusiones sobre el proceso del envejecimiento en sí mismo.

Es necesario comentar ahora el valor que tienen los parámetros que hemos elegido como medio para explorar la inmunidad humoral. Desde los estudios sistemáticos de Good y su escuela^{25, 26}, se consideran dos sistemas inmunitarios relativamente independientes: por un lado, un sistema timo-dependiente, cuyo vehículo efector son los linfocitos y que es responsable de la inmunidad celular, y por otro lado, un sistema "bursa"-dependiente, ubicado en determinados órganos linfoides (placas de Peyer, amígdalas, etc.), que están constituidos esencialmente por células plasmáticas, y cuyo vehículo efector son los anticuerpos circulantes. Este sistema "bursa"-dependiente es el responsable de la inmunidad denominada "humoral". En consecuencia, pode-

mos explorar la inmunidad humoral, o bien desde un punto de vista morfológico, observando las células plasmáticas de los órganos linfoides, o bien desde un punto de vista funcional, analizando el estado y comportamiento de los anticuerpos. Las bases moleculares de los anticuerpos son actualmente bien conocidas, gracias a una larga serie de estudios, iniciada en 1930 por Tiselius⁸⁵, con el fraccionamiento electroforético del suero y la ulterior identificación de los anticuerpos en la fracción electroforética gamma por Tiselius y Kabat⁸⁶, y continuada por el análisis inmunolectroforético, introducido por Grabar y Williams³¹, que ha permitido identificar hasta ahora cinco clases distintas de gamma-globulinas con función de anticuerpos^{11, 12 y 22} a las que, siguiendo la propuesta de Heremans, se las conoce con la denominación de inmunoglobulinas³⁸. Esta larga serie de estudios ha culminado en los últimos años con la realización de numerosos trabajos inmunoquímicos que han permitido esclarecer la organización estructural molecular de las inmunoglobulinas^{41, 81, 84 y 90}. Por tanto, para explorar la inmunidad humoral es necesaria la exploración de las gamma-globulinas anticuerpos o inmunoglobulinas, tanto globalmente, por electroforesis, como individualmente, mediante análisis inmuno-electroforético y determinación inmunoquímica cuantitativa.

Aunque el análisis cualitativo y cuantitativo de las inmunoglobulinas es necesario para la valoración de la inmunidad humoral, no es suficiente, ya que a este análisis escapan alteraciones funcionales de los anticuerpos, que pueden aparecer aún con un nivel normal de inmunoglobulinas²⁵. Por ello es necesario estudiar además la respuesta humoral específica frente a agentes externos y eventualmente también frente a los propios antígenos estructurales, mediante la investigación de autoanticuerpos. Hemos elegido el estudio de la respuesta frente a la infección estreptocócica, porque ella es muy

frecuente en todos los grupos de edad⁶⁷ y porque la antiestreptolisina O aparece frente a casi todos los tipos de estreptococos y es expresiva de una infección actual, ya que desaparece en poco tiempo^{49, 55 y 56}.

Con la determinación de la proteína C reactiva hemos querido investigar las alteraciones de la inmunidad humoral inespecífica. La naturaleza de esta proteína es discutida. Se ha sugerido la posibilidad de que constituya un precursor inespecífico de anticuerpos⁷⁵. Nosotros mismos hemos sugerido la posibilidad de que trate de una inmunoglobulina de características especiales^{28 y 63}. En cualquier caso, la proteína C reactiva es uno de los "reactantes de fase aguda" más significativos⁷⁵. Por ello, su determinación en personas de edad avanzada supone un dato estimable para descubrir eventuales alteraciones de la inmunidad a estas edades.

Con respecto a los autoanticuerpos, la elección del "factor reumatoide" (FR) y del "factor LE" ha sido debida a dos razones: en primer lugar, la frecuente asociación de ambos factores a procesos degenerativos de frecuente aparición en la vejez¹⁵; en segundo lugar, ambos factores aparecen con relativa frecuencia en el suero de personas normales y en diversos procesos patológicos, tanto juveniles como de la edad madura^{15, 17, 36, 40 y 70}. Todo ello es indicio, tanto de que posiblemente desempeñan un papel fisiológico, como de que su intervención en el proceso involutivo de la senectud es muy probable.

Según lo que hemos venido comentando hasta ahora, los parámetros que hemos considerado en este estudio permiten adquirir una visión amplia y detallada de los mecanismos humorales de la inmunidad y permiten afirmar conclusiones concretas sobre el comportamiento global de este sistema. Discutida la representati-

dad de la casuística estudiada y el valor de los parámetros investigados, hemos de comentar ahora el significado de las alteraciones que hemos observado. En lo sucesivo trataremos de interpretar el posible papel que desempeñan estas alteraciones en el proceso del envejecimiento.

Las alteraciones disproteinémicas que hemos podido objetivar mediante el proteinograma han consistido fundamentalmente en un aumento de las globulinas, con predominio de las del tipo gamma. Estos resultados están en concordancia, en general, con determinaciones semejantes realizadas por otros autores^{9, 16 y 24}. Menos constantemente han sido señalados también incrementos de las fracciones alfa²⁴, mientras que las beta-globulinas han sido halladas tanto normales o ligeramente disminuidas²⁴, como aumentadas^{16 y 60}. La disminución de la albúmina, que ha sido señalada repetidas veces^{9, 16 y 60}, la hemos podido constatar en todos los casos estudiados. En contraste, la relativa normalidad encontrada para la prealbúmina sugiere que la hipoalbuminemia no sólo es relativa, es decir, secundaria a la hipergammaglobulinemia, sino que se debe a una disminución auténtica de la misma, posiblemente condicionada por una disminución de la síntesis protéica en la vejez. Estudios realizados recientemente en ancianos, para valorar al metabolismo protéico mediante isótopos, apoyan esta interpretación⁹². Experimentalmente se ha podido demostrar que efectivamente hay una notable disminución de la síntesis protéica en animales viejos⁵³. Los estudios inmunoelectroforéticos de la disproteinemia senil son aún muy escasos. En algún estudio aislado ha sido señalado el incremento de la alfa-1-glicoproteína, alfa-2-ceruloplasmina y beta-lipoproteína, así como de las inmunoglobulinas (Igs.) por medio de este método³². Nuestros resultados confirman estos hallazgos previos, aunque hemos encontrado también un incremento significativo de la alfa-2-macro-

globulina. Desde el punto de vista clínico nos interesa resaltar la normalidad de la transferrina, que nos parece un dato característico de la disproteinemia senil, en contraste con la marcada disminución de esta proteína en otros tipos de disproteinemias, tales como la hepática, en los que también existen hipoalbuminemia e hipergammaglobulinemia⁶¹.

La presencia de gamma-globulinas "anormales" o "componentes M" ha sido denunciada también ocasionalmente en trabajos recientes^{19, 20 y 34}, en un porcentaje de ancianos equivalente al que nosotros hemos obtenido, del 8 %. Pero si consideramos todos los casos en que hemos apreciado mínimas alteraciones cualitativas de las inmunoglobulinas, la proporción se eleva hasta el 22 %.

Hasta ahora son escasas las determinaciones cuantitativas de inmunoglobulinas en sujetos de edad avanzada^{32 y 77}. Si bien el aumento de IgA e IgG ha sido confirmado siempre, existen discrepancias sobre la concentración de IgM, que ha sido considerada normal³² e incluso discretamente disminuida⁷⁷, mientras que nosotros la hemos encontrado uniformemente elevada. Estas discrepancias son comprensibles si se tiene en cuenta que la IgG es una proteína poco difusible y que por ello su valoración por inmunodifusión está condicionada por la mayor o menor duración del tiempo de difusión. En general está justificado el considerar el incremento de las inmunoglobulinas como una característica del envejecimiento, en llamativo contraste con la comprobada disminución senil de la síntesis protéica en general^{53 y 92}. Ello sugiere que la hipergammaglobulinemia senil no es relativa, secundaria a la hipoalbuminemia, si no está condicionada por un proceso activo de excesiva producción de anticuerpos.

La disminución progresiva con la edad de la formación de anticuerpos antiestreptolisina O está conforme con la co-

nocida menor capacidad de reacción de los ancianos frente a factores infecciosos. Según hemos visto anteriormente, la disminución del título de anticuerpos antiestreptolisina es indicativa de una disminución de la respuesta inmunitaria específica frente a agentes externos. Efectivamente ha sido comunicado que en la vejez existe una menor capacidad de formación de anticuerpos frente a diversos agentes infecciosos tales como *E. coli*, salmonellas, proteus y algunos virus^{70 y 77}, como frente a diversas sustancias protéicas administradas experimentalmente^{3, 29 y 74}. Asimismo, es conocida la disminución progresiva con la edad de isoanticuerpos anti-A y anti-B⁵¹.

No es difícil comprender el incremento senil de la proteína C reactiva, si la consideramos como un precursor inespecífico de anticuerpos⁷⁵, ya que, como hemos visto, las inmunoglobulinas-anticuerpos están también aumentados a estas edades. Nosotros hemos podido demostrar en 1968, por primera vez^{28 y 63}, que esta proteína es un componente normal del suero. Keitel⁴² ha encontrado una elevada incidencia de proteína C reactiva en el suero de ancianos afectados de diversas enfermedades vasculares degenerativas, atribuyendo valor diagnóstico a su determinación. Nuestros resultados no invalidan esta interpretación de manera absoluta, pero sugieren que su incremento está más bien en relación con el aumento general de inmunoglobulinas y que no tiene un significado diagnóstico-diferencial específico. Parece constituir un índice de una probable exaltación de los mecanismos inespecíficos de la inmunidad humoral. Por otra parte, el paralelismo entre el incremento de la tasa de inmunoglobulinas y el del título de proteína C reactiva no sólo es característico de la senectud, sino que se presenta también en diversas circunstancias fisiológicas, como el embarazo⁷¹, y patológicas, como cirrosis hepática²¹, reumatismo po-

liarticular^{21 y 80} y algunas paraproteinemias^{21 y 23}.

El aumento en la edad senil de los autoanticuerpos investigados, factor reumatoide y factor L E, ofrece diversas posibilidades de interpretación, según el papel que se atribuya a los autoanticuerpos en general. La mayor incidencia en la vejez de autoanticuerpos tales como los antieritrocitarios¹⁸, antitiroideos²⁷, antimucosa-gástrica³⁷ y también el factor reumatoide y el L E^{2, 4, 9 y 36}, ha sido observada en varias ocasiones. La curva de aumento que hemos registrado tanto para el factor reumatoide como para el L E ofrece un peculiar punto máximo en la edad media de la vida. Heimer y col.³⁶ han obtenido una curva semejante para factor reumatoide, si bien el punto máximo coincide en su observación con edades más avanzadas, pero no hemos encontrado en la literatura observaciones semejantes, ni para éstos, ni para otros autoanticuerpos, a excepción de los autoanticuerpos antitiroideos, que en la observación de Goodman y col.²⁷ mostraron un comportamiento semejante. Parece ser, sin embargo, que este tipo de incremento de los autoanticuerpos es bastante característico, ya que nosotros lo hemos observado también para el factor L E. La explicación más probable es el que muchos de los sujetos con títulos elevados de autoanticuerpos en las décadas medias de la vida ya habrán sucumbido precozmente, a consecuencia de enfermedades autoinmunes, degenerativas o no. La mayor incidencia en la edad media de la vida de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso o la tiroiditis^{52, 72 y 82}, parece apoyar esta interpretación.

El papel patológico y el posible papel fisiológico de los autoanticuerpos en general permanece aún oscuro. Además de su clara intervención en enfermedades de patogenia autoinmune, tales como tiroiditis, glomerulonefritis, lupus eritematoso,

etc., su presentación ocasional en sujetos normales de todas las edades^{8b, 9, 27, 36, 43 y 59} sugiere que desempeñan una función fisiológica. Esta función podría ser el transporte de ciertos productos catabólicos, como sugirió Grabar³⁰, o bien constituir por sí mismos un sistema de catabolización⁸², o podrían tener, finalmente, un papel en la eliminación de ciertas sustancias o, incluso células, que hubiesen sido producidas defectuosamente a consecuencia de la aparición de mutaciones espontáneas^{5, 33, 43, 44 y 66}. Es bien conocida la aparición o el incremento de mutaciones genéticas espontáneas durante la vejez^{39, 79, 83 y 89}. Si esto último es cierto, el incremento del nivel de autoanticuerpos puede tener como misión contrarrestar la excesiva aparición de células y productos anormales. Sería un modo de defenderse el organismo de ser invadido por estos productos de la mutación. Esta interpretación es concordante, por otra parte, con la exaltación de los restantes mecanismos humorales de la inmunidad. Hemos visto que hay, efectivamente, un aumento de los mecanismos humorales inespecíficos, o precursores de la defensa específica (proteína C reactiva) y un aumento de inmunoglobulinas circulantes. Por estar el sistema inmunitario urgentemente exigido para la defensa frente a la invasión de productos anormales de la mutación del propio organismo, estaría descuidado el sistema defensivo frente a sustancias procedentes del exterior; sobre todo, teniendo en cuenta que la síntesis protéica está disminuida a estas edades y que, por tanto, la producción de anticuerpos no puede ser tan masiva como sería necesario para poder subvenir tanto a la exaltada defensa frente a las sustancias anormales del interior, como frente a los antígenos llegados del exterior. Teleológicamente es comprensible que de las dos funciones inmunitarias, se desempeñe con preferencia la que tiene mayor importancia vital, esto es, la que puede defen-

derse de las mutaciones del propio organismo, o función autoinmunitaria. Por el contrario, la defensa frente a la invasión por sustancias externas pasa a tener una importancia secundaria desde el punto de vista vital.

Algunos datos experimentales apoyan esta interpretación. Se ha comunicado, en efecto, que tanto la irradiación, como la administración de fármacos inmunosupresores a animales experimentales, que

provocan en éstos un notable incremento del número de mutaciones, como sucede durante el proceso natural del envejecimiento, no sólo no acortan la vida media de estas especies animales, sino que la prolongan^{83 y 88}. Ello es debido, probablemente, a que simultáneamente se provoca una inhibición del sistema inmunitario, impidiendo a éste desarrollar una excesiva función autoinmune deletérea.

SUMMARY

Alterations of different immunological humoral factors with age are studied

Comparing results obtained in groups of young normal people with those studied in the 65-90 bracket and analysing according to age distribution determinations of anti-streptolysin O, C reactive protein, rheumatoid factor and L.E. phenomenon we found a progressive increase of hypoalbuminemia and hypergammaglobulinemia with age.

Alfa 2 ceruloplasmin, alfa 2 macroglobulin

and betalipoproteins were seen to be increased in electrophoretic determinations. Qualitative alterations and a quantitative increase by 100 % of immunoglobulines were also found.

Are found an increase in the immunological humoral response especially that of autoimmunity.

The work shows the role that these alterations play contributing to the aging process.

BIBLIOGRAFÍA

1. ANDREW, W. *Cellular changes with age*. Chas C. Thomas, Springfield, 1952.
2. ARNON, E., R. VARGUES y P. L. LECHEVALLIER. *Presse Méd.*, 69: 54, 1961.
3. BAER, H. y R. T. BOWSER. *Science*, 140: 1211, 1963.
4. BALL, J. y J. S. LAWRENCE. *Ann. Rheumat. Dis.*, 20: 235, 1961.
5. BENDITT, E. P. *Lab. Invest.*, 10: 1031, 1961.
6. BIRREN, J. E. *Handbook of Aging*. University of Chicago Press, Chicago, 1959.
7. BLUMENTHAL, H. T. y A. W. BERNIS. *Adv. Gerontol. Res.*, 1: 289, 1964.
8. BURCH, P. R. *J. Theoret. Biol.*, 12: 397, 1966.
- 8a. BRAY, J. P., J. A. BASS y F. L. ESTES. *Texas Rept. Biol. Med.*, 22: 220, 1964.
9. CAMMARATA, R. J., G. P. RODNAN y W. N. JENSEN. *Arch. Int. Med.*, 111: 330, 1963.
10. CANNAT, A. y M. SELIGMANN. *Sem. Hóp.*, 41: 1090, 1965.
11. COHEN, S. y C. MILSTEIN. *Adv. Immunol.*, 7: 1, 1967.
12. COHEN, S. y P. P. PORTER. *Adv. Immunol.*, 4: 287, 1964.
13. COMFORT, A. *Aging. The Biology of Senescence*. Routledge and Kegan Paul, London, 1964.
14. CURTIS, H. J. *Biological mechanisms of aging*. Chas C. Thomas, Springfield, 1966.
15. CHRISTIAN, C. L. *Rheumatoid Arthritis*. Editado por Samter, M. (ed): *En Immunological diseases*, Little Brown, Boston, 1965.
16. DAS, B. C. y S. K. BHATTACHARYA. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 39: 569, 1961.

17. DRY, J. y M. F. KAHN. *Gerontologia*, 9: 222, 1964.
18. DYBKJAER, E. y F. KISSMEYER-NIELSEN. *Vox Sang.*, 12: 429, 1967.
19. ELLMAN, W. I., R. N. PACHAS, R. S. PINALS y K. J. BIOCH. *Gastroenterology*, 57: 138, 1969.
20. ENGLISOVA, M., M. ENGLIS, V. KYRAL, K. KOURILEK y K. DVORAK. *Exp. Gerontol.*, 3: 125, 1968.
21. FISCHER, F., T. STENDERUP, T. BANGSBO-ANDERSEN y T. CLEMMESSEN. *Ugestr. Laeg.*, 120: 305, 1958.
22. FRANKLIN, E. C. *Progr. Allergy*, 8: 58, 1964.
23. GEYER, G. Z. *Klin. Med.*, 156: 25, 1959.
24. GINGOLD, N., C. CUTCUDACHE y S. BALAN. *Sang*, 29: 327, 1958.
25. GOOD, R. A. y J. FINSTAND. *Fed. Proc.*, 23: 285, 1964.
26. GOOD, R. A. y B. W. PAPERMASTER. *Adv. Immunol.*, 4: 1, 1964.
27. GOODMAN, M., M. ROSENBLATT, J. S. GOTTLIEB, J. MILLER y C. H. CHEN. *Arch. gen. Psychiat.*, 8: 518, 1963.
28. GÖTZ, H., M. PÉREZ MIRANDA y F. SCHEIFFARTH. *Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.*, 7: 275, 1969.
29. GOULLET, P. y H. KAUFMANN. *Gerontologia*, 10: 76, 1964-1965.
30. GRABAR, P. *Texas Rep. Biol. Med.*, 15: 1, 1957.
31. GRABAR, P. y C. A. WILLIAMS. *Biochem. biophys. Acta*, 10: 193, 1953.
32. HAFERKAMP, O., D. SCHLETTWEIN-GSELL, H. SCHWICK y K. STÖRIKO. *Gerontologia*, 12: 30, 1966.
33. HAHN, H. P. v. *Gerontologia*, 8: 168, 1963.
34. HALLEN, J. *Acta Med. Scand.*, 173: 737, 1963.
35. HALLMANN, L. *Klinische Chemie und Mikroskopie*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, 1966.
36. HEIMER, R., M. LEVIN y E. RUDD. *Amer. J. Med.*, 35: 175, 1963.
37. HERBEUVAL, R., J. DUHEILLE, G. CUNY y A. HAAGEN. *Presse. Med.*, 75: 731, 1967.
38. HEREMANS, J. F. *Clin. Chim. Acta*, 4: 639, 1959.
39. HILDEMANN, W. H. y R. L. WALFORD. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 123: 417, 1966.
40. HOLLMAN, H. R. Editado por M. SAMTER. En *Immunological diseases*. Little Brown, Boston, 1965.
41. KABAT, E. A. *Structural concepts in immunology and immunochemistry*. Holt, Rinehart and Winston, Inc. New York, 1968.
42. KEITEL, W. Z. *Ges Inn. Med.*, 13: 591, 1958.
43. KLEIN, G. Editado por W. J. BURDETTE (ed.). En *Methodology in Mammalian Genetics*. Holden-Day. San Francisco, 1963.
44. KLEIN, G., J. PALM. En *Wistar Institute Press*. Philadelphia, 1965.
45. KNUDSON, A. G. *Genetics and disease*. McGray-Hill. New York, 1967.
46. KOHN, J. *Ärztl. Lab.*, 10: 297, 1964.
47. KORENCHEVSKY, V. *Physiological and Pathological Aging*. Ed. Bourne, G. H. Hafner. New York, 1961.
48. LAFFIN, R. J., W. A. BARDAWIL, W. N. PACHAS y J. S. MCCARTHY. *Am. J. Path.*, 45: 465, 1964.
49. LANCEFIELD, R. C. *J. Immun.*, 89: 307, 1962.
50. LETTERER, E. *Dtsch. med. Wschr.*, 52: 2527, 1963.
51. LEWI, S. *Gerontologia*, 14: 160, 1968.
52. MACKAY, I. R. y F. M. BURNET. *Autoimmune Diseases. Pathogenesis, Chemistry and Therapy*. Chas. C. Thomas. Springfield, 1963.
53. MAINWARING, W. I. P. *Biochem. J.*, 113: 867, 1969.
54. MANCINI, G., A. O. CARBONARA y J. F. HEREMANS. *Immunochemistry*, 2: 235, 1965.
55. MCCARTY, M. En *Streptococcal Infections*. Columbia University Press, 1954.
56. MCCARTY, M. *J. exper. Med.*, 102: 11, 1955.
57. MCKEOWN, F. y PATHO. *Pathology of the Aged*. Butterworths. London, 1965.
58. MILCH, R. A. *Gerontologia*, 7: 129, 1963.
59. MÜLLER-EBERHARD, H. J. *Proc. 10th. Internat. Congr. Rheumatic Dis.*, 2: 791, 1961.
60. NÖCKER, J. y H. BENN. *Z. Alternsforsch.*, 9: 328, 1956.
61. PÉREZ MIRANDA, M. *Elektrophoretische und immunchemische Differentialdiagnose des Leberparenchymschadens*. Dissertationsarbeit. Univ. Erlangen - Nürnberg, 1968.
62. PÉREZ MIRANDA, M. y H. GÖTZ. *Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.*, 6: 499, 1968.
63. PÉREZ MIRANDA, M. y H. GÖTZ. *Lancet*, 2: 1305, 1968.
64. PÉREZ MIRANDA, M. y P. LISO IRURZUN. *IX Congr. N. Soc. Esp. Med. Int.* Página 2. Santiago de Compostela, 1970.
65. PÉREZ MIRANDA, M., A. CHORDI y E. ORTIZ DE LANDÁZURI. Editado por A. HEYMER y W. GRONEMAYER. En *Allergie u. Immunitätsforschung*. Página 207. Schattauer-Verlag. Stuttgart, 1968.
66. PÉREZ MIRANDA, M., F. SCHEIFFARTH, H. WARNATZ y H. GÖTZ. *Immunologische Studien mit Zellfraktionen von Mäusenieren*. En A. HEYMER y W. GRONEMAYER. Página 213, cit. 65.
67. RAMMENKAMP, C. H., JR. *Harvey Lect.*, 51: 113, 1955-1956.

68. ROBERT, L., M. ROBERT, M. MOCZAR y E. MOCZAR. *Nat. Rech. Sci.*, 169: 395, 1968.
69. ROUX, J. L. *Helv. med. Acta*, 21 (suppl. 34): 1, 1954.
70. ROWLEY, M. I., H. BUCHANAN y I. R. MACKAY, *Lancet*, 2: 24, 1968.
71. ROZANSKY, R. y B. BERCOVICI. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, 92: 4, 1956.
72. SAMTER, M. y H. L. ALEXANDER. *Immunological diseases*. Little Brown, Boston, 1965.
73. SCHEIDEGGER, J. J. *Int. Arch. Allergy*, 7: 103, 1955.
74. SCHUMACHER, S. S. y B. N. PREMACHANDRA. *J. Gerontol.*, 23: 311, 1968.
75. SCHWARTZ, G. *Das C-reaktive Protein*. Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1963.
76. SCHWARTZ, P. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 27: 393, 1965.
77. SCHWICK, H. G. and W. BECKER. *Humoral antibodies in older humans*. Editado por E. GRUGDMANN. En *Symposium on Immunopathology*. Karger Basel, 1969.
78. SHOCK, N. W. (ed.). *Perspectives in Experimental Gerontology*. Chas. C. Thomas Springfield, 1966.
79. SONNEBORN, T. M. *Some comments on the general biological situation with regard to aging*. Editado por B. L. STREHLER. En *The biology of aging*. A. Inst. Biol. Sci. Washington, 1960.
80. STAEHELIN, A. *Helv. Med. Acta*, 23: 628, 1956.
81. STANWORTH, D. R. y G. I. PARDOE. *Structural and biological characteristic of the immunoglobulins*. Editado por D. M. WEIR. En *Handbook of experimental Immunology*. Blackwell Sci. Pub. Oxford-Edimburgo, 1967.
82. STEFFEN, C. *Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunopathologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1968.
83. STREHLER, B. L. *Time, cells and aging*. Academic Press, New York-London, 1962.
84. SUZUKI, T. *Immununchem*, 6: 587, 1969.
85. TISELIUS, A. *Nova Acta Reg. Soc. Sci. Uppsal.*, 4: 7, 1930.
86. TISELIUS, A. y A. E. KABAT. *J. exper. Med.*, 69: 119, 1939.
87. VERZÁR, F. *Lectures on Experimental Gerontology*. Editado por J. E. Birren. Chas. C. Thomas, Springfield, 1963.
88. WALFORD, R. L. *Adv. Gerontol. Res.*, 2: 159, 1967.
89. WATSON, J. D. *Molecular biology of the gene*. W. A. Benjamin, New York, 1965.
90. WEBB, T. y H. C. GOODMAN. *Mod. Trends Immunol.*, 2: 151, 1967.
91. WOOLHOUSE, H. W. *Aspects of the biology of aging*. Cambridge University Press, London, 1967.
92. YAN, H. Y. y J. J. FRANKS. *J. Lab. Clin. Med.*, 72: 449, 1968.