

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL E HISTOQUIMICO DEL ALVEOLO PULMONAR DEL ACURE

Jorge García Tamayo*

RESUMEN

Se describe la ultraestructura del alvéolo pulmonar del acure y se señalan las diferencias existentes entre las células epiteliales y el macrófago alveolar. Se discute el origen de los cuerpos laminares del neumocito granular y se demuestra la relación entre éstos, los cuerpos multivesiculares y el aparato de Golgi. Se demuestra la actividad de fosfatasa ácida en el aparato de Golgi y levemente en los cuerpos laminares a diferencia de la intensa reacción observada en los macrófagos. Se hacen consideraciones sobre el metabolismo del neumocito granular y el posible papel de la fosfatasa ácida en la formación y secreción de fosfolípidos.

INTRODUCCION

El alvéolo pulmonar está tapizado por dos tipos de células epiteliales: Tipo I, el neumocito membranoso y Tipo II, la gran célula alveolar o neumocito granular.

Estudios con el microscopio electrónico han demostrado numerosas vacuolas en el citoplasma de los neumocitos granulares, las cuales se observaron llenas de material osmiofílico. Estas estructuras se han denominado cuerpos laminares o citosomas y se cree que ellos contienen fosfolípidos, proteínas y mucopolisacáridos.

En el año 1929 Von Neergaard (40) sugirió que la elasticidad del pulmón es debida en parte a la tensión superficial de una sustancia que debería tapizar los alvéolos. Desde entonces se han hecho numerosos estudios sobre las propiedades tensioactivas de homogenizados de tejido pulmonar, los cuales han llegado a demostrar la presencia en el pulmón de una sustancia con gran actividad de tensión superficial, la cual aparece en su mayoría compuesta por di-palmitil-lecitina (2,11,20,33).

* Laboratorio de Microscopía Electrónica, Servicio de Patología, Hospital General del Sur, Maracaibo, Venezuela.

Estudios morfológicos han relacionado las propiedades tensioactivas de los extractos de tejido pulmonar con el número y la apariencia de los cuerpos laminares de los neumocitos granulares (8,19). Estas observaciones han llegado a concluir que las estructuras laminares contenidas en las vacuolas de las células alveolares tipo II son los precursores del material fosfolipídico que tapiza la superficie alveolar. A pesar de que se han hecho estudios histoquímicos y autorradiográficos que demuestran la importancia del neumocito granular como la célula capaz de sintetizar lípidos en el pulmón, (13) no existe una evidencia morfológica para poder explicar la naturaleza exacta de la sustancia fosfolipídica que tapiza el alvéolo.

Uno de los obstáculos para estudiar la composición de los cuerpos laminares del neumocito granular es la similitud morfológica que existe entre estas células y los macrófagos alveolares, debido a la presencia de cuerpos laminares en ambas células. Numerosos investigadores han postulado que los neumocitos fagocíticos o macrófagos alveolares son células mesenquimáticas con un origen diferente al de las células epiteliales que tapizan el alvéolo pulmonar; sin embargo, con frecuencia se ha propuesto que el neumocito granular se desprende de la pared alveolar y se transforma en un macrófago.

Actualmente se piensa que el macrófago alveolar es realmente una célula fagocítica derivada de los monocitos de la sangre o de los macrófagos fijos del intersticio pulmonar y por lo tanto, ella no debe jugar un papel importante en el metabolismo lipídico del pulmón (22,26).

Con respecto al origen y la morfología de los cuerpos laminares del neumocito granular se han tejido diversas hipótesis. Al principio se consideraban los cuerpos laminares del neumocito granular como provenientes de mitocondrias transformadas (29); posteriormente se pensó que éstos se originaban en áreas de degradación citoplasmática (4) y finalmente, que tenían alguna relación con el sistema lisosómico (17,31). La fosfatasa ácida, enzima característica de los lisosomas (12), fue demostrada en las cisternas del aparato de Golgi y aunque débilmente, también en algunas de las vacuolas que contenían los cuerpos laminares (16,17). En colaboración con Valdivia, reportamos la localización de la fosfatasa ácida en las células del epitelio alveolar (16) y hemos observado marcadas diferencias ultraestructurales entre las células del epitelio del alvéolo pulmonar, las células fagocíticas libres y las células mesenquimáticas intersticiales.

El objeto de este trabajo es describir algunas de las diferencias mencionadas y llamar la atención sobre la relación que nuestros hallazgos histoquímicos pueden tener con la actividad funcional de las células alveolares.

MATERIAL Y METODO

Para realizar este estudio utilizamos acures de un peso aproximado de 500 a 700 gramos; la mayor parte de ellos de la raza Dunkling-Hartley, albinos.

La técnica utilizada en estos estudios ha sido la fijación en glutaraldehido al 3% y osmio al 2%, deshidratación en alcoholes o en acetona, inclusión en Epon-Araldita, o en Araldita.

Se aplicó el método de Gomori (5) para estudiar la actividad de fosfatasa ácida.

Se practicaron cortes de una micra y ultrafinos utilizando cuchillos de vidrio y diamante y las observaciones se han realizado en un microscopio electrónico RCA-MU3 del Departamento de Patología de la Universidad de Wisconsin en Estados Unidos y un Microscopio JEM 7A del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Servicio de Patología del Hospital General del Sur en Maracaibo, Venezuela.

RESULTADOS

Neumocito granular.

Célula redondeada, con microvellosidades en su superficie generalmente ubicada en una especie de nicho que le forma la pared alveolar. Su citoplasma muestra abundantes cuerpos laminares de mediana densidad electrónica; algunos de los cuerpos laminares se ven formados por hileras concéntricas o paralelas de estructuras con apariencia de membranas. Los cuerpos laminares están revestidos por una membrana con la estructura trilaminar característica. En el citoplasma se ven ribosomas, abundantes mitocondrias, retículo endoplasmático liso, aparato de Golgi, y en la vecindad de éste se ven cuerpos multivesiculares y estructuras en forma de vacuolas conteniendo en su interior vesículas más pequeñas y membranas organizadas en forma paralela o concéntricamente. En la parte basal de la célula se pueden ver ocasionalmente vesículas de pinocitosis; también se identifica la membrana basal. Desmosomas simples unen los neumocitos granulares con las prolongaciones delgadas de los neumocitos membranosos. En ocasiones se observa el material de los cuerpos laminares saliendo de sus vesículas hacia el espacio alveolar. Se demostró actividad para la fosfatasa ácida en el aparato de Golgi, en las cisternas y las vesículas vecinas a esta estructura en los cuerpos multivesiculares, en los cuerpos laminares pequeños y con menos intensidad en los grandes cuerpos laminares. Algunos cuerpos laminares no mostraban reacción, siendo este resultado negativo más frecuente que la observación de la actividad enzimática.



Fig. 1.— Neumocito granular (NG) con cuerpos laminares (CL) en su citoplasma y vellosidades cortas en su superficie. Se observan también un neumocito membroso (NM) y en el intersticio un histiocito (H) y un fibroblasto (F) con abundante retículo-endoplasmático rugoso. 7.830 X.

Neumocito membranoso.

Esta célula es prominente en el espacio alveolar, no presenta microvellosidades, se une a las células epiteliales contiguas por medio de desmosomas y cubre la mayor parte de la superficie alveolar. En el citoplasma se ven mitocondrias, algunos cuerpos de inclusión densos revestidos por una membrana, retículo endoplasmático liso, ribosomas. La actividad de fosfatasa ácida se detectó en algunas cisternas del aparato de Golgi y en algunos cuerpos densos citoplasmáticos.

Macrófago alveolar.

El macrófago se vio libre en el espacio alveolar; presenta prolongaciones citoplasmáticas en forma de pseudópodos y un núcleo ovalado generalmente indentado. En el citoplasma se ven mitocondrias, aparato de Golgi prominente, ribosomas y numerosos cuerpos de inclusión limitados por una unidad de membrana y mostrando gránulos de diversa densidad y de forma variable. Con frecuencia en estas inclusiones se ven grupos de



Fig. 2.— Detalle del citoplasma de un neumocito granular donde se observa el aparato de Golgi. Se ven también varios cuerpos multivesiculares (flecha) y cuerpos laminares (CL), mitocondrias (M) y parte del núcleo. 25.350 X.

membranas, concéntricas o en organización paralela, semejante a los cuerpos laminares descritos en el neumocito granular. Se observó intensa actividad para la fosfatasa ácida en el aparato de Golgi y en las vacuolas y vesículas que se encontraban en su periferia, al igual que en los cuerpos de inclusión descritos. En la membrana celular y en algunas vesículas de pinocitosis en ocasiones también se observó la reacción.

Células intersticiales.

Hay dos tipos de células; una con la apariencia de un fibroblasto, con abundante retículo endoplasmático rugoso con ribosomas en el citoplasma, mitocondrias y aparato de Golgi; la otra célula se identifica más con un histiocito con citoplasma más abundante, menor número de ribosomas, pseudópodos y cuerpos de inclusión densos, revestidos por una membrana. En ambos tipos de células la actividad de fosfatasa ácida se localizó en las cisternas del aparato de Golgi y en algunas de sus vesículas. También se observó ocasionalmente, actividad de fosfatasa ácida en los cuerpos de

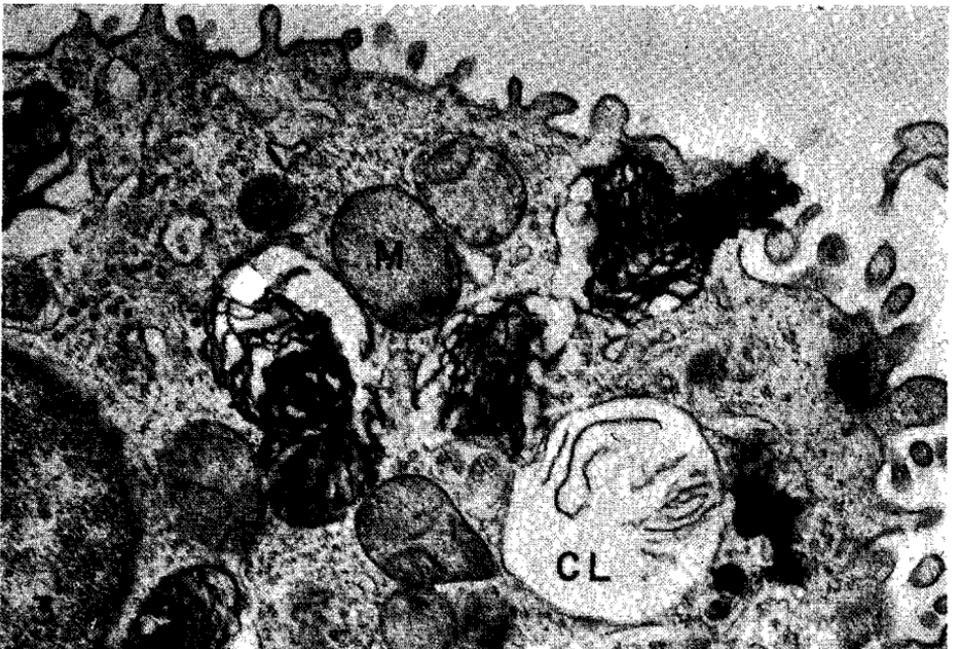


Fig. 3.— Parte del citoplasma de un neumocito granular que muestra varios cuerpos laminares (CL), uno de ellos excretando hacia la luz alveolar el contenido del citosoma. Se ven también mitocondrias (M), microvellosidades en la superficie y parte del núcleo. 25.350X.

inclusión descritos entre el epitelio y el endotelio. Estos dos tipos de células descritos se encuentran en un espacio denominado intersticio alveolar, en el cual se ven fibras colágenas y reticulares. En ocasiones también se pueden observar haces de fibras musculares lisas.

Endotelio.

Las células endoteliales también presentan membrana basal, notándose con frecuencia que la barrera alvéolo capilar está constituida únicamente por el endotelio y el epitelio, entre los cuales se disponen sus membranas basales confundiendo en una sola estructura amorfa. En otras áreas es frecuente que la célula endotelial esté situada sobre una zona del intersticio. El núcleo de la célula endotelial es ovalado y en su citoplasma se observan mitocondrias, ribosomas, algunas cisternas lisas, gránulos con apariencia de lisosomas y con frecuencia se ven vesículas de pinocitosis. Se observó actividad de fosfatasa ácida en algunos cuerpos de inclusión rodeados por una unidad de membrana y ocasionalmente en algunas cisternas del complejo de Golgi.

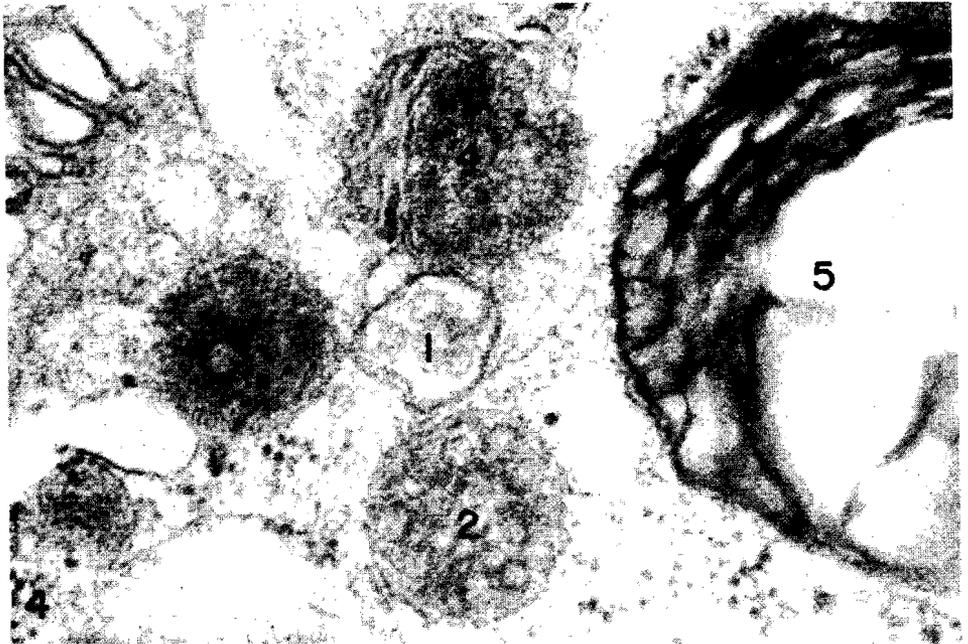


Fig. 4.— Secuencia numerada del mecanismo de formación de los cuerpos laminares a partir de cuerpos multivesiculares. 42.500 X.

DISCUSION

Es un hecho bien conocido que el pulmón tiene un metabolismo lipídico activo (14,26,27).

Existe suficiente evidencia de que la interfase entre el aire y el tejido alveolar está cubierta por una sustancia tensioactiva la cual es rica en el fosfolípido dipalmitil lecitina; esta sustancia en la superficie del alvéolo pulmonar va a actuar disminuyendo la tensión superficial y por lo tanto va a contribuir a mantener la estabilidad alveolar (2).

Desde el año de 1945 Macklin, utilizando el microscopio de luz, señaló que el neumocito granular era la célula responsable de la producción de esta sustancia tensioactiva (21).

Buckingham y Avery estudiaron la naturaleza de este material fosfolipídico y convinieron en llamarlo surfactante (8). La disminución de la actividad de tensión superficial producida por los extractos de tejido pulmonar en casos de membrana hialina (25), de atelectasia pulmonar (1)

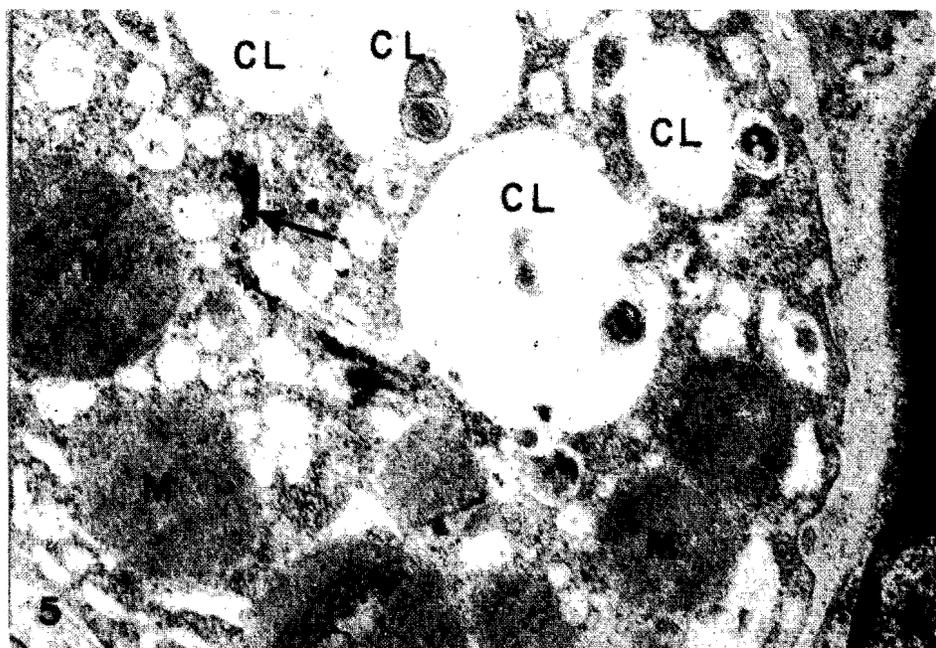


Fig. 5.— Fosfatasa ácida en el aparato de Golgi de un neumocito granular (flecha). El material teñido únicamente con uranilo muestra en forma borrosa las mitocondrias (M) y los cuerpos laminares (CL). 7.830 X.

y en casos de oclusión de la arteria pulmonar (34), han relacionado estas enfermedades con un supuesto déficit en la producción de surfactante por el epitelio alveolar. Estudios comparativos en ratones, demostraron como la actividad de tensión superficial de los extractos de tejido pulmonar y el tiempo en el cual aparecían los cuerpos laminares en los neumocitos granulares eran paralelos, considerándose estos citosomas como los precursores del surfactante pulmonar (8,10,19,42).

Los primeros estudios al microscopio electrónico interpretaron la formación de los cuerpos laminares del neumocito granular como estructuras derivadas de mitocondrias transformadas (29). Posteriormente se sugirió que la morfogénesis y la secreción de los cuerpos laminares era un fenómeno funcional del epitelio alveolar (6) y se demostró la presencia de fosfatasa ácida en el aparato de Golgi y en los cuerpos laminares (4,15), evidenciándose cambios focales autolíticos en el citoplasma de esta célula. Sorokin (30) estudió la morfología y la histoquímica de la gran célula alveolar y propuso que la síntesis de los fosfolípidos debe ocurrir en los cuerpos multivesiculares y en las membranas agranulares del neumocito

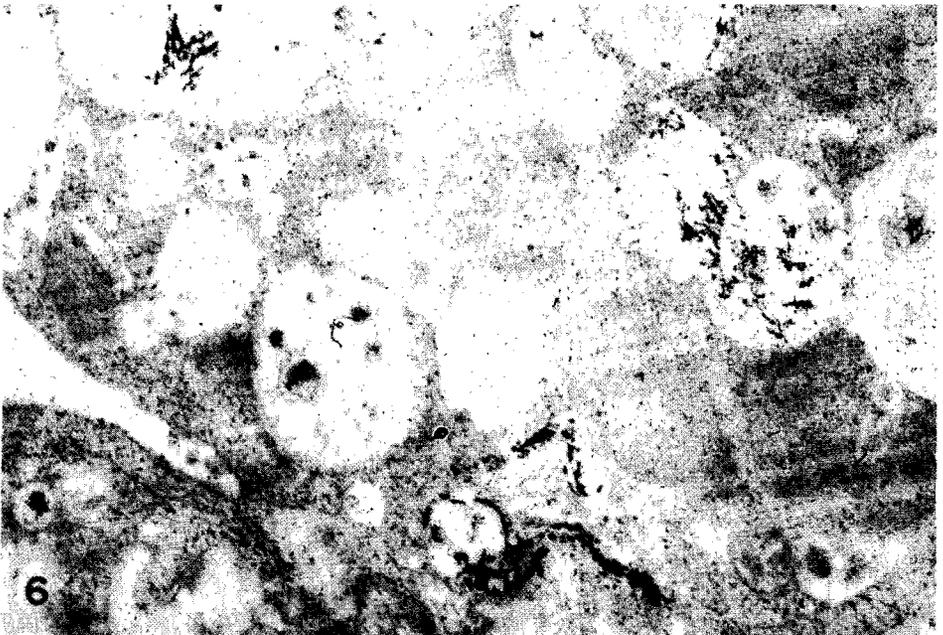


Fig. 6.— Material sin tinción que demuestra actividad de fosfatasa ácida en el aparato de Golgi y en los cuerpos laminares de un neumocito granular 7.830X.

granular (31). Nosotros observamos desde hace algunos años como los macrófagos alveolares presentaban todos los estadios intermedios descritos en la formación de los lisosomas, de acuerdo con lo postulado sobre la actividad de la enzima fosfatasa ácida (24) en el aparato de Golgi, en los lisosomas puros, en los cuerpos multivesiculares, en los fagolisosomas y citolisosomas y finalmente también en las vacuolas que contenían estructuras de aspecto mielínico similares a los cuerpos laminares. La reacción enzimática observada en los lisosomas de los macrófagos alveolares era muy acentuada, diferenciándose de la débil y muy bien localizada actividad presente en el aparato de Golgi y en los cuerpos laminares del neumocito granular.

Estos hallazgos nos señalaron una diferencia notable entre las células alveolares epiteliales y los macrófagos, diferencia ésta que venía a corroborar la impresión sobre el origen distinto de estos dos tipos de células (26). Los cuerpos laminares presentes en el citoplasma de los macrófagos alveolares, parecían formar parte del sistema lisosómico de esas

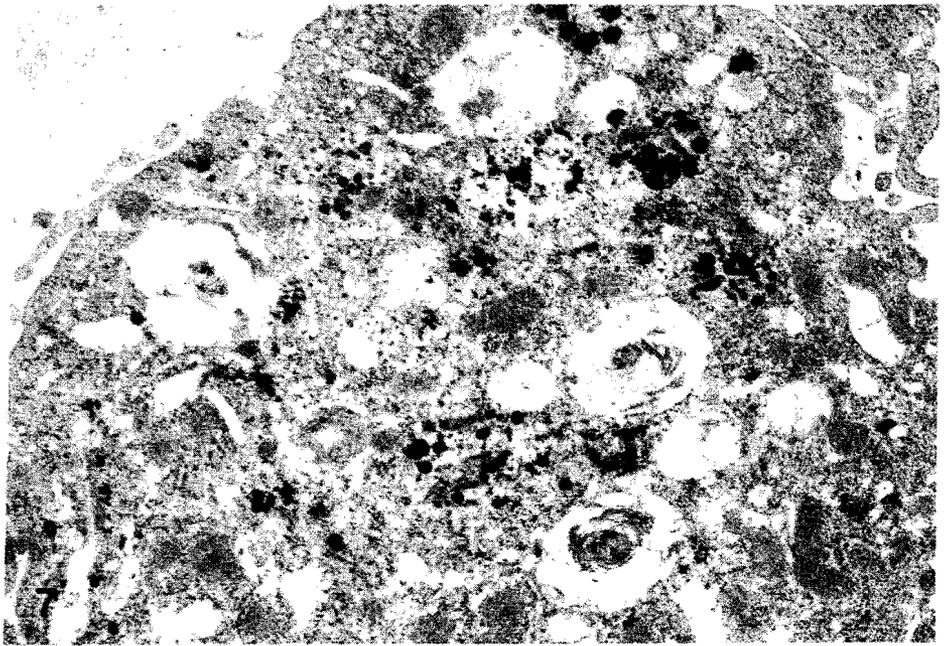


Fig. 7.— Parte de un macrófago alveolar mostrando actividad de fosfatasa ácida en los lisosomas. 7.830X.

células, las cuales tienen una actividad fagocítica activa, e intervienen en funciones de defensa a nivel del alvéolo. El hecho de que en los macrófagos intersticiales no se observan cuerpos laminares, viene a demostrar que estas células, cuando están en el intersticio, no fagocitan el material fosfolipídico que se encuentra en la superficie alveolar.

Cuando se observa el citoplasma del neumocito granular y la variedad de cuerpos multivesiculares y pequeños cuerpos laminares, se evidencian numerosas etapas intermedias entre los cuerpos multivesiculares y los pequeños cuerpos laminares para llegar finalmente a los cuerpos laminares grandes característicos de esta célula. Si se compara la débil actividad enzimática de fosfatasa ácida del neumocito granular con la reacción observada en los macrófagos, podemos afirmar que los cuerpos laminares del neumocito granular, si bien pertenecen al sistema lisosómico por el hecho de presentar actividad de fosfatasa ácida en sus membranas, no parecen estar dispuestos para cumplir una función fagocítica con formación de vacuolas digestivas como los macrófagos, sino que parecen más bien formar parte de un sistema secretor dentro de la célula alveolar grande.

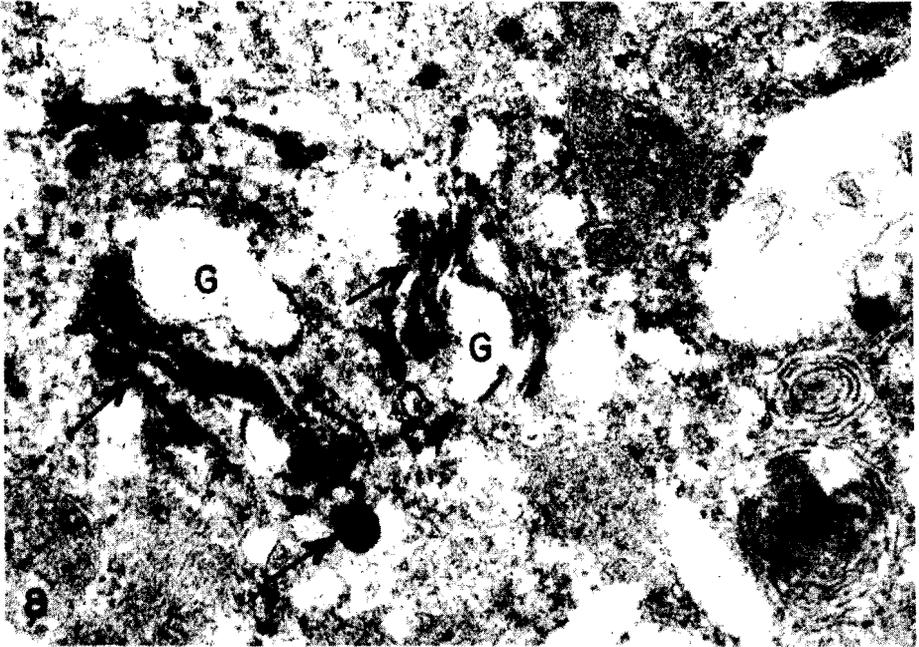
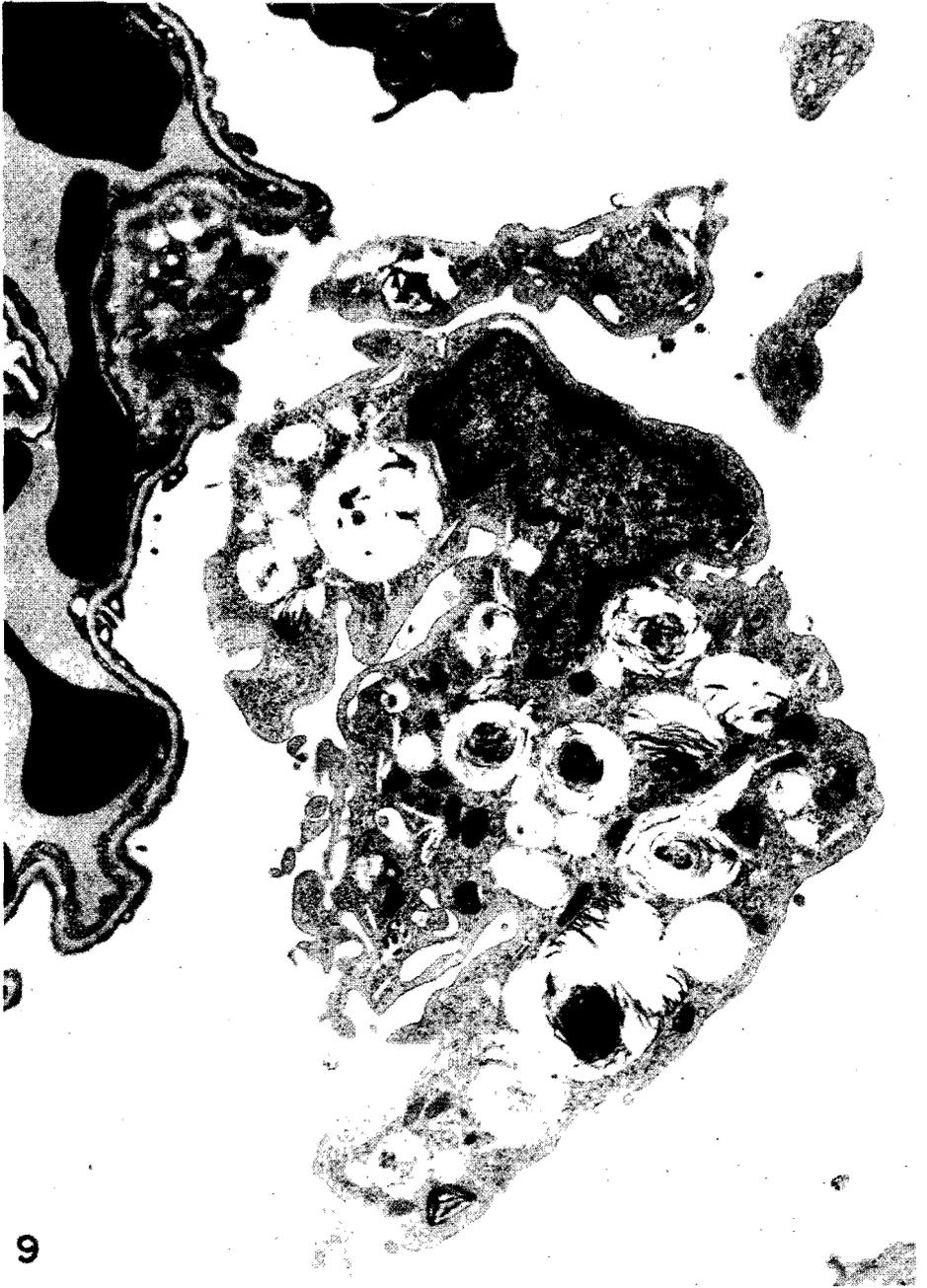


Fig. 8.— Actividad de fosfatasa ácida (flecha) en el complejo de Golgi (G) y citolisomas de un macrófago alveolar. 23.200X.

Estudios previamente realizados en la Universidad de Wisconsin por Valdivia, demostraron como acures que vivían en condiciones de hipoxia crónica (36,38) y acures intoxicados con tetracloruro de carbono, o etionina (37,39), presentaban vacuolas de grasa en el citoplasma de los neumocitos granulares. Cambios similares, han sido demostrados en algunos ratones después de dietas prolongadas con grasa (15). Nosotros hemos observado vacuolas de grasa en las células alveolares de acures sometidos a períodos de ayuno de 24 y 48 horas y en la intoxicación experimental con kerosene (resultados no publicados). Estos estudios parecen indicar que existen variadas situaciones de tipo experimental que pueden inducir alteraciones en el contenido lipídico de los cuerpos laminares del neumocito granular; por lo tanto, es posible que los cambios en la apariencia y en la osmiofilia de los cuerpos laminares reflejen alteraciones en la síntesis o en el proceso de secreción de lípidos por estas células. Es también posible que estas alteraciones de los cuerpos laminares estén relacionados con un incremento de los ácidos grasos libres o de los triglicéridos en la sangre circulante. De esta manera, la lipólisis o cualquiera condición que altere los mecanismos de síntesis de lípidos podría provocar el almacenamiento de grasa en los neumocitos granulares.

Se sabe que la célula alveolar tipo II tiene un metabolismo oxidativo muy activo (3,28,30). Se han observado reacciones histoquímicas muy marcadas para enzimas como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, confirmando la importancia del ciclo glicolítico y de la vía de las pentosas en el metabolismo de estas células (14). El NADPH, considerado como un nucleótido indispensable en la síntesis de lípidos, se ha encontrado en grandes cantidades en el neumocito granular; este hallazgo está de acuerdo con las necesidades de estas células en lo que respecta a nucleótidos transportadores de hidrógeno los cuales deben ser utilizados para la síntesis de la lecitina (9,35). El metabolismo oxidativo de la glucosa parece ser el responsable de la abundancia del NADPH y del L-alfa glicerofosfato en esta célula.

Para sintetizar la lecitina usualmente existen dos reacciones enzimáticas, una de ellas es la vía de la metilación de la fosfatidil-etanolamina y la otra, la reacción de la fosforilcolina-glicérido-transferasa. La primera reacción se localiza en el retículo endoplasmático y no parece ser la vía metabólica principal, a pesar de que se ha sugerido que la metilación de los fosfolípidos podría tener lugar en el retículo endoplasmático del neumocito granular como un proceso selectivo para la síntesis de la lecitina (23). La reacción de la fosforilcolina glicérido-transferasa es la cadena enzimática principal que lleva hacia la formación de la lecitina a partir de la L-alfa Beta Di-glicérido. Este sistema enzimático ha sido demostrado en microsomas de hígado de rata (7). La fosfatasa del ácido fosfatídico es una enzima que juega un papel muy importante en la síntesis de diglicéridos, a



9

Fig. 9.— Macrófago alveolar con abundantes pseudópodos, lisosomas, cuerpos laminares y núcleo indentado, libre en la luz del alvéolo. En un lado se ve la pared de un capilar alveolar con varios glóbulos rojos en su luz. 7.830 X.

partir del ácido fosfatídico y ha sido identificada en fracciones celulares con características de sedimentación similares a los lisosomas (41). También se ha reportado NADPH en una fracción similar, diferente de la fracción mitocondrial y de la microsomal y correspondiendo a la fracción lisosómica (32). Aunque el ácido fosfatídico es su sustrato preferido, también es capaz de hidrolizar B-glicerofosfato (18).

Estos hallazgos contribuyen a señalar que la presencia de la fosfatasa ácida dentro de los citosomas multilaminares del neumocito granular, pudiera tener un significado importante y no simplemente circunstancial. La fosfatasa ácida y tal vez algunas otras enzimas hidrolíticas podrían actuar ligadas a la síntesis y a la secreción temprana de los fosfolípidos por el neumocito granular. Nuestros resultados histoquímicos nos llevan a postular que las estructuras citoplasmáticas que contienen fosfatasa ácida pueden no solamente estar relacionadas con las funciones digestivas y degradativas del citoplasma, sino que también pudieran jugar un papel importante en ciertas actividades metabólicas y secretoras de algunas células, como sería en este caso del neumocito granular. Sin embargo, son necesarios estudios histoquímicos y ultramicroscópicos, haciendo variar las condiciones fisiológicas y utilizando modelos experimentales para poder dilucidar algunas de las interrogantes planteadas sobre el verdadero significado del neumocito granular en la fisiopatología del alvéolo pulmonar.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Enrique Valdivia y al personal técnico del Departamento de Patología de la Universidad de Wisconsin, E.U.A., quienes durante los años 1966-1968 aportaron su colaboración para realizar la mayor parte de este trabajo. A los Sres. J. Vivas y E. Murcia, quienes ofrecieron su colaboración técnica en el Hospital General del Sur.

Ultrastructure and histochemistry of the pulmonary alveoli in the guinea pig.

García Tamayo J (Laboratorio de Microscopía Electrónica, Servicio de Patología, Hospital General del Sur, Maracaibo, Venezuela). *Invest Clín* 13 (2): 58-75, 1972.— The ultrastructure of the pulmonary alveoli in the guinea pig is described. The lamellar bodies of the granular pneumocyte are formed at the Golgi apparatus from multivesicular bodies and membrane containing dense bodies. Acid fosfatase activity in these structures was positive but the positivity of the reaction was little if compared with that observed in the alveolar macrophage. Differences between the fagocitic function of the macrophage and the metabolic activity of the granular pneumocyte are stressed. A posible role of acid phosphatase in the metabolism of the granular pneumocyte is considered.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- AVERY ME, MEAD J: Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Amer J Dis Children* 97: 517-523, 1961.
- 2- AVERY ME, SAID S: Surface phenomenon in lungs in health and disease. *Medicine* 44: 503-526, 1965.
- 3- AZZOPARDI A, THURLBEOK WM: The oxidative enzyme pattern in developing and adult mice and adult rabbit. *Lab Invest* 16: 706-716, 1967.
- 4- BALIS JU, CONEN PE: The role of the alveolar inclusion bodies in the developing lung. *Lab Invest* 13: 1215-1229, 1964.
- 5- BARKA T, ANDERSON PJ: *Histochemistry: Theory, practice and bibliography*. Hoeber Med. Div. Harper & Row Pub. 1963, p 238-242.
- 6- BENSCH K, SCHAEFER K, AVERY ME: Granular pneumocytes: electron microscopic evidence of their exocrinic functions. *Science* 145: 1318-1319, 1964.
- 7- BREMER J, GREEMBERG D: Methyl transferring enzyme system of microsomes in the biosynthesis of lecithin (Phosphatidylcholine). *Bioch Biophys Acta* 46: 205-216, 1961.
- 8- BUCKINGHAM S, AVERY ME: Time of appearance of lung surfactant in the foetal mouse. *Nature* 193: 688, 1962.
- 9- BUCKINGHAM S, HEINEMANN HO, SOMMERS SC, MCNARY WF: Phospholipid synthesis in the large alveolar cell. *Amer J Pathol* 48: 1027-1041, 1966.
- 10- CAMPICHE MA, GAUTIER A, HERNANDEZ EI, RAYMOND A: An electron microscope study of the fetal development of human lung. *Pediatrics* 32: 976-994, 1963.
- 11- CLEMENTS JA: Surface tension of lung extracts. *Proc Soc Exper Biol Med* 95: 170-172, 1957.
- 12- DE DUVE C: *Biological approaches to Cancer Chemotherapy*. (Harris SC, ed). New York. Academic Press, 1961, p 101-112.

- 13- FAULKNER CS: The role of the granular pneumocyte in surfactant metabolism. An autoradiographic study. *Arch Path* 87: 521-525, 1969.
- 14- FELTS JM: Biochemistry of the lung. *Health Physics* 10: 973-979, 1964.
- 15- GARBANI R, TARTARA D, CARELLI E: Lipid localization in the lung after induced lipaemia: an electron microscopic study. *Med Thoracalis* 24: 193-202, 1967.
- 16- GARCIA TAMAYO J, VALDIVIA E: Acid phosphatase activity in the granular pneumocyte. *Amer J Path* 50: 47A, 1967.
- 17- HATASA K, NAKAMURA T: Electron microscope observations of lung alveolar epithelial cells of normal young mice with special reference to formation and secretion of osmiophilic lamellar bodies. *Zeitschrift für Zellforsch* 68: 266-277, 1965.
- 18- HILL EE, LANDS WEM: *Phospholipid Metabolism. Lipid Metabolism.* (Wakil SJ, ed) New York. Academic Press, 1970, p 222.
- 19- KIKKAWA Y, MOTOYAMA EK, COOK CD: The ultrastructure of the lung of lambs. *Amer J Path* 47: 877-903, 1965.
- 20- KLAUS MH, CLEMENTS JA, HAVEL RJ: Composition of surface active material isolated from beef lung. *Proc Nat Acad Sc US* 47: 1858-1859, 1961.
- 21- MACKLIN CC: The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumocytes. *Lancet* 266: 1099-1104, 1954.
- 22- MOORE RD, SCHOOMBERG M: Alveolar lining cells and pulmonary reticuloendothelial system of the rabbit. *Amer J Path* 45: 991-1006, 1964.
- 23- MORGAN TE, FINLEY TN, FIALKOWI H: Comparison of the composition and surface activity of alveolar and whole lung lipids in the dog. *Bioch Bioph Acta* 106: 403-413, 1965.
- 24- NOVIKOFF AB, ESSNER E, QUINTANA N: Golgi apparatus and lysosomes. *Fed Proc* 23: 1010-1022, 1964.

- 25- PATTLE R, CLATREAUX AE, DAVIES PA, CAMERON AH: Inability to form a lung lining film as a cause of the respiratory distress syndrome in the newborn. *Lancet* 11: 469-473, 1962.
- 26- PINKETT MO, COWDREY CR, NOWELL PC: Mixed hematopoietic and pulmonary origin of alveolar macrophages as demonstrated by chromosome markers. *Amer J Path* 48: 859-867, 1966.
- 27- POPJAK C, BEECHMANS ML: Extrahepatic lipid synthesis. *Biochem J* 47: 233-238, 1950.
- 28- SAID SI, KLEIN RM, NORELL LW, MADDOX YT: Metabolism of alveolar cells: Histochemical evidence and relation to pulmonary surfactant. *Science* 152: 657-659, 1966.
- 29- SCHULZ H: The submicroscopic anatomy and pathology of the lung. Springer Verlag Berlin, 1959.
- 30- SOROKIN S: A study of development in organ cultures of mammalian lungs. *Develop Biol* 3: 60-83, 1961.
- 31- SOROKIN S: A morphologic and cytochemical study on the great alveolar cell. *J Histochem Cytochem* 14: 884-897, 1967.
- 32- TAPPEL AL, RAGAB H: Lysosomes. *Fed Proc* 23: 488, 1964.
- 33- TIERNEY DF, CLEMENTS JA, TRAHAN HJ: The metabolic activity of pulmonary lecithins. *Physiologist* 8: 288, 1965.
- 34- TOOLEY WH, GARKNER R, THUNG N, FINLEY T: Factors affecting the surface tension of lung extracts. *Fed Proc* 20: 428, 1961.
- 35- TYLER WS, PEARSE AGE: Oxidative enzymes in the interalveolar system of the rat. *Thorax* 20: 149-152, 1965.
- 36- VALDIVIA E, SONNAD J, D' AMATO J: Fatty changes of the granular pneumocyte. *Science* 151: 213-214, 1966.
- 37- VALDIVIA E, SONNAD J: Fatty changes of the granular pneumocyte in CCl₄ intoxication. *Arch Path* 81: 514-519, 1966.
- 38- VALDIVIA E, GARCIA TAMAYO J: Pulmonary alterations in experimental chronic hypoxia. *Amer J Path Sci Proc* 47a, 1967.

- 39- VALDIVIA E, HOFFMAN RL, GARCIA TAMAYO J: Alveolar wall alterations in acute ethionine intoxication. *Fed Proc* 27: 250, 1968.
- 40- VON NEERGAARD K: Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik Die Retraktion-Skraft der Lunge abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. *A Ges Exp Med* 66: 373-394, 1929.
- 41- WILGRAM GF, KENNEDY EP: Intracellular distribution of some enzymes catalysing reactions in the biosynthesis of complex lipids. *J Biol Chem* 233: 2615-2619, 1963.
- 42- WOODSIDE GL, DALTON AJ: The ultrastructure of lung tissue from newborn and embryo mice. *J Ultrastr Res* 2: 28-54, 1958.
-