

PAPEL DE LA CITRATO LIASA EN LA SINTESIS LIPIDICA EN GRANULOCITOS HUMANOS

Elena Ryder y Diego Martinucci*

RESUMEN

Midiendo la incorporación de citrato-1,5 -C¹⁴ en la fracción saponificable de extractos lipídicos de granulocitos humanos, se demuestra que la vía del citrato es operante en estas células como productora de grupos acetilo para la síntesis grasa, y que su actividad es dependiente de la concentración de glucosa en el medio de incubación.

Bajo ciertas condiciones, ésta puede llegar a valores relativamente importantes, si los comparamos con la síntesis obtenida cuando se usa acetato como precursor.

Se encontró además que la citrato liasa está presente en la fracción citosólica, con una actividad de 1,51 nanomoles por min por mg de proteína, lo que confirma la presencia de esta vía en granulocitos maduros humanos.

INTRODUCCION

Las células blancas representan un buen sistema biológico para el estudio de fenómenos bioquímicos. Estas células se pueden obtener en completo estado de pureza, libre de tejido conectivo, de células provenientes

* *Instituto de Investigación Clínica, Apartado 1151, Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.*

de las paredes de los vasos sanguíneos y muchos otros elementos que ordinariamente hacen difícil la caracterización bioquímica de otros tejidos. Mas aún, los leucocitos son un tejido fácilmente disponible, sobre todo cuando se estudian seres humanos, y en muchos casos han sido usados para confirmar o establecer el diagnóstico de errores ingénitos del metabolismo (6, 7, 9, 18, 26, 27).

Con respecto a la síntesis de lípidos, se sabe que los leucocitos presentan una activa incorporación de acetato en lípidos, cien-mil veces mayor que los eritrocitos y cien veces superior a las plaquetas (15). Una gran proporción es incorporada en los triglicéridos, y en menor extensión, en los fosfolípidos. Estos lípidos sintetizados en los leucocitos (y en las plaquetas) aparecen rápidamente en el plasma. La actividad específica de los lípidos neutros plasmáticos se eleva más rápidamente que la de los fosfolípidos, lo que sugiere la existencia de un intercambio significativo entre los lípidos de las células blancas y los plasmáticos, siendo los triglicéridos los más activos (15).

Los leucocitos dependen de dos mecanismos para el mantenimiento de su composición lipídica: un transporte selectivo a través de la membrana celular y la producción o modificación intracelular de ácidos grasos y lípidos complejos. La importancia relativa de cada uno de estos mecanismos no se conoce con exactitud, pero debe existir un mecanismo regulatorio muy efectivo ya que los leucocitos mantienen, bajo diferentes condiciones metabólicas (4, 19), una composición lipídica relativa muy constante.

Sin embargo, existen condiciones que afectan la velocidad de síntesis. Leucocitos aislados de perros, a los cuales se les ha sometido a dietas conocidas como inductoras de arterioesclerosis, mostraron una síntesis superior en un 50% a los controles; pero este aumento no fué específico para ninguna fracción lipídica en particular (3).

También se menciona una correlación negativa entre la maduración celular y la síntesis de lípidos. En el caso de los leucocitos aislados de pacientes leucémicos, no sólo se refieren altas velocidades de síntesis, sino que en éstos, el porcentaje es mayor para la fracción de fosfolípidos, mientras que en los controles, se sintetizan más glicéridos (14). Tanto los eritrocitos (25) como los leucocitos jóvenes (12), parecen poseer todo el sistema sintetizador de grasas, pero pierden esta capacidad con la maduración celular.

Los ácidos grasos que van a formar parte de los triglicéridos y lípidos complejos, pueden ser sintetizados por mas de una vía. La vía *de novo*, la

cual se encuentra localizada en la fracción citosólica de muchos tejidos, se inicia con una reacción de carboxilación del acetil CoA para producir malonil CoA y es catalizada por la carboxilasa del acetil CoA. Este acetil CoA proviene principalmente, de la escisión por la citrato liasa, del citrato translocado de la mitocondria. El ácido palmítico es el principal producto final de la reacción completa, en la cual interviene, después de la carboxilasa, el complejo enzimático conocido como sintetasa de los ácidos grasos. Se puede estimar que la presencia de estas tres enzimas: citrato liasa, carboxilasa del acetil CoA y sintetasa de los ácidos grasos, es reflejo de actividad de síntesis de novo de los ácidos grasos.

Cuando se usa acetato- C^{14} como precursor de la síntesis grasa, este compuesto debe ser transformado en acetil CoA por la tiorquinasa acética e ingresar al pool del acetil CoA extramitocondrial. Si la vía de novo es operante, encontraremos una gran proporción de la radioactividad en ácidos grasos de 16 carbonos. Si la radioactividad aparece primordialmente en ácidos grasos de cadena más larga, se asume que la síntesis grasa está siguiendo otra vía que se conoce como alargamiento de cadena. Está otra vía es de localización mitocondrial y en ella, las unidades acetilo son agregadas sucesivamente a cadenas de ácidos grasos pre existentes, sin mediar la formación del malonil CoA. Por lo tanto la radioactividad estará localizada en las fracciones terminales de los ácidos grasos de cadena larga (C_{16} en adelante).

Para la mayoría de los autores (3, 4, 16) la vía predominante en los leucocitos es la del alargamiento de cadena, ya que los ácidos grasos sintetizados a partir de acetato $-C^{14}$, aparecen marcados en gran proporción en el grupo carboxilo terminal. Majerus y Lastra (12) reportan que ni los leucocitos ni los eritrocitos humanos maduros son capaces de sintetizar ácidos grasos de novo, debido a que carecen de actividad de carboxilasa del acetil CoA. Sin embargo, el hecho de que se haya encontrado en las plaquetas el sistema completo para la síntesis de novo, incluyendo la carboxilasa (13), y que se haya demostrado la presencia del complejo de sintetasa de los ácidos grasos en los leucocitos maduros, con una actividad similar a la de las plaquetas, sin función aparente (12), nos hizo revisar estos conceptos sobre las probables vías de síntesis de los ácidos grasos en leucocitos humanos maduros.

MATERIAL Y METODOS

Se tomaron muestras de sangre de donantes sanos, en ayunas de por lo menos 10 h, procedentes del Banco de Sangre de Maracaibo, usando como anticoagulante una solución de etilendiaminotetraacetato (EDTA)

al 5% en ClNa al 0,9%, pH 7,3, y procesadas en la hora siguiente a su extracción.

Aislamiento de los granulocitos.— A dos volúmenes de sangre completa se agregó un volumen de Dextran T-500 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) al 3% en EDTA (1,5%)-ClNa (0,7%), pH 7,4. Después de mezclar suavemente por inversión, las células rojas se dejaron sedimentar por 30 min a 4°. El sobrenadante rico en granulocitos se separó de los eritrocitos sedimentados y se centrifugó a 500 g por 10 min a 4°. Las células rojas contaminantes del botón leucocitario fueron eliminadas por dos a tres lisis con agua destilada fría, por no más de 30 seg, seguidas de una normalización de la isotonicidad del medio con el agregado de una solución de ClNa al 10%.

Los granulocitos se separaron del material hemolizado por centrifugación a 500 g por 10 min. Finalmente se suspendieron en buffer Krebs-Ringer-bicarbonato libre de Ca (KRB) pH 7,3 (1 ml por cada 10 ml de sangre). La concentración promedio de granulocitos en esta suspensión fue de $3,92 \pm 1,29 \times 10^7$ células por ml, lo que equivale a un 56% de rendimiento.

Incubación para la síntesis de lípidos.— Se incubaron volúmenes iguales de granulocitos suspendidos en buffer KRB (2 a 3×10^7 células) en un volumen final de 1 ml, con $2,5 \mu\text{Ci}$ de citrato- $1,5\text{-C}^{14}$ (8-10 mCi/mole) ó $2 \mu\text{Ci}$ de acetato- 1-C^{14} (60 mCi/mole) (New England Nuclear Corp., Boston, Mass., USA) en presencia de $5 \mu\text{g}$ (0,12 U) de insulina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) y concentraciones variables de glucosa y citrato o acetato no marcado. El tiempo de incubación fue de 2 h como regla general (a excepción del experimento donde se estudió la linealidad de la reacción con el tiempo de incubación), a 37° en atmósfera de aire y bajo agitación permanente.

Extracción de los lípidos totales marcados.— Finalizado el período de incubación, la mezcla de reacción se vertió en 10 ml de cloroformo-metanol 2:1 (v) y se dejó bajo agitación magnética por una hora. Para la separación de las dos fases, se usó la centrifuga clínica. Se eliminó la fase acuosa superior, y se procedió al lavado de la fase clorofórmica con una solución de citrato de sodio 0,1 M para ayudar a eliminar el citrato radioactivo no fijado (o acetato de sodio 0,1 M en los experimentos de incorporación de acetato). Este lavado se repitió tres veces. Finalmente, la fase clorofórmica fué evaporada a 37° en botellas de contaje y el residuo disuelto en 10 ml de Econofluor (New England Nuclear Corp., Boston, Mass., USA) y contados en un espectrómetro de centelleo líquido, con una eficiencia del 85%.

Separación de las fracciones saponificadas y no saponificadas.— Una vez finalizada la reacción de síntesis, a la mezcla se le añaden 0,2 ml de ácido sulfúrico 10 N, 1 ml de KOH al 30% y 2 ml de alcohol absoluto. Se calienta a 60° por una hora. La fracción no saponificable se extrae primero mediante tres lavados con hexano y luego la saponificable, previa acidificación con 0,5 ml de HCl concentrado, con otros tres lavados con hexano (27). Todas las fracciones aisladas fueron lavadas con citrato de sodio 0,1 M y luego evaporadas. Finalmente se contaron como en el paso anterior.

Determinación de la actividad de citrato liasa.— El botón leucocitario puro, obtenido después de las lisis hipotónicas, se suspende en sacarosa 0,25 M, a la cual se le ha añadido heparina (Liquemine, Roche) a una concentración final de 100 U/ml y se procede a su homogenización. Se centrifuga inmediatamente a 100.000 g por una hora para evitar cualquier lesión que pudiera producir la heparina a mitocondrias o gránulos (17). Finalmente se obtiene la fracción sobrenadante. Para la determinación de la actividad se usó el método espectrofotométrico de Srere (23) a pH 7,4 y 30°C. La actividad se expresa en nanomoles por minuto por mg de proteína citosólica.

Determinación de proteínas.— Las proteínas leucocitarias totales fueron determinadas en alícuotas de la suspensión de granulocitos en buffer KRB, sonicadas por 15 seg a una intensidad del 30%, en un Biosonik III (Bronwill Scientific Rochester, NY, USA); y las citosólicas, en la fracción obtenida después de centrifugar a 100.000 g, el homogenado en sacarosa-heparina. Se practicó el método de Lowry y col (11), usando albúmina bovina cristalina como patrón.

Cálculo de la incorporación de citrato-1,5- C¹⁴ en productos marcados.— La utilización del citrato-1,5- C¹⁴ se calculó de la radioactividad obtenida en los residuos lipídicos aislados. Como solo el carbono 1 del citrato usado como precursor pasa a ser incorporado a los ácidos grasos (8, 22), para los cálculos se tomó la mitad de la actividad específica del compuesto original marcado.

RESULTADOS

Características de la preparación de leucocitos.— Los leucocitos aislados presentan características morfológicas normales al ser teñidos con Giemsa (Fig. 1), notándose un predominio neto (90%) de polimorfonucleares. La viabilidad, determinada por la exclusión del Azul Tripan, fué de un 90%. La cantidad de proteínas totales por 10¹⁰ células fue de 1,31 g (promedio de 22 preparaciones). La contaminación plaquetaria de la preparación

fue de 10 plaquetas por cada leucocito; contaminación que si bien puede considerarse alta, funcionalmente no es importante, ya que bajo nuestras condiciones de estudio, la capacidad sintetizadora de lípidos por las plaquetas es prácticamente desechable (resultados no reportados). Sin embargo, en peso, pueden estar contribuyendo a alterar el valor real de las proteínas representadas por los leucocitos, en aproximadamente un 22%.

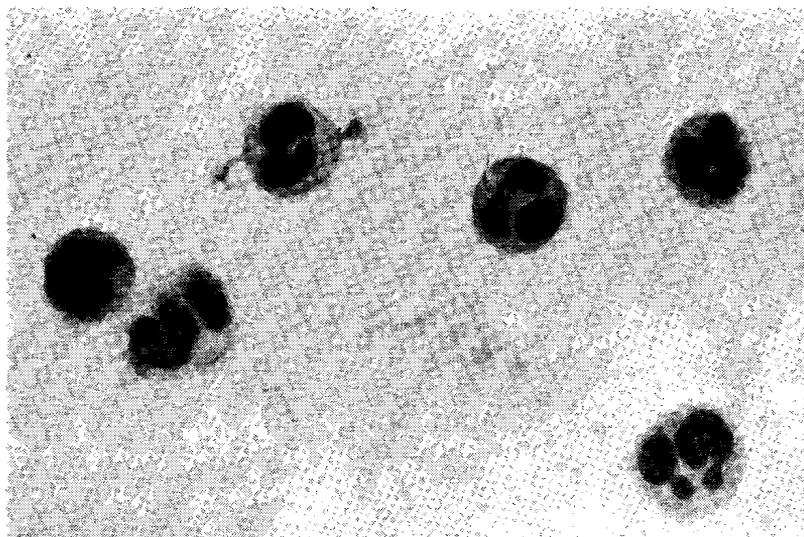


Fig. 1.— Características morfológicas de la suspensión leucocitaria en buffer KRB, coloreados con Giemsa.

Incorporación de citrato-1,5- C^{14} en los lípidos leucocitarios.— Se encontró que tanto en ausencia de glucosa como en presencia de glucosa 10 mM, hay una incorporación lineal del citrato marcado en lípidos, dependiente de la concentración del compuesto en el medio de incubación. Esta reacción, bajo condiciones fijas de citrato 10 mM y glucosa 10 mM, también es lineal con respecto al tiempo de incubación, hasta por 4 h a 37°, y es estrictamente dependiente de la concentración de células usadas en cada experimento (Fig. 2).

Si comparamos la incorporación de acetato-1- C^{14} , bajo las mismas condiciones experimentales (Tabla I), encontramos que ésta es sólo 1,5 veces superior a la observada cuando se usa citrato como precursor. Esta diferencia tal vez sea menor si tomamos en cuenta que al usar acetato 20 mM, tenemos la concentración máxima útil de penetración; sin embargo, como el citrato es de más difícil penetración a través de la membrana celular, a 20 mM, estamos aún en la fase lineal.

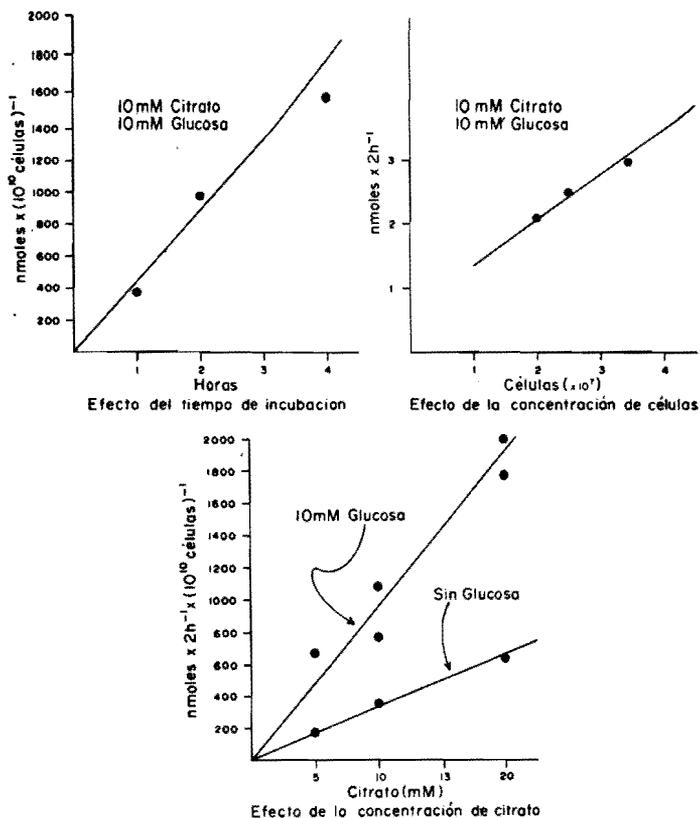


Fig. 2.— Cinética de la incorporación de citrato-1,5-C¹⁴ en lípidos de granulocitos humanos intactos.

TABLA I

VELOCIDAD DE SINTESIS DE LÍPIDOS A PARTIR DE PRECURSORES MARCADOS EN GRANULOCITOS HUMANOS INTACTOS

CITRATO-1,5-C¹⁴	
(20 mM citrato)	1900 nmoles x 2 h ⁻¹ x (1 x 10 ¹⁰ cel) ⁻¹
(10 mM glucosa)	1,33 nmoles x 2 h ⁻¹ x mg ⁻¹ (*)
ACETATO-1-C¹⁴	
(20 mM acetato)	2930 nmoles x 2 h ⁻¹ x (1 x 10 ¹⁰ cel) ⁻¹
(10 mM glucosa)	2,06 nmoles x 2 h ⁻¹ x mg ⁻¹ (*)

(*) Proteínas leucocitarias totales.

Efecto de la concentración de glucosa.— Una característica interesante de esta reacción es que la incorporación de citrato-1,5- C^{14} en lípidos es afectada positivamente por la concentración de glucosa en el medio de incubación. A medida que se eleva la concentración de glucosa, se nota un aumento progresivo de la síntesis de lípidos a partir del citrato (Fig. 3). Este aumento es más evidente entre concentraciones de 2 a 5 mM de glucosa ($p < 0,05$), concentraciones que pueden considerarse fisiológicas.

Distribución de la radioactividad entre las fracciones saponificables y no saponificables.— Cuando se estudió la distribución de la radioactividad entre estas dos fracciones lipídicas, se observó que solo un 25% estaba localizada en la fracción no saponificable; mientras que la fracción saponificable contenía la mayor parte de la radioactividad (Tabla II).

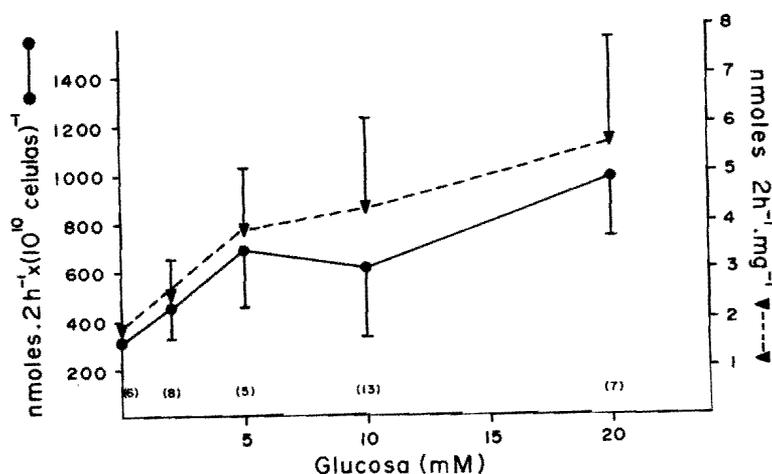


Fig. 3.— Efecto de la concentración de glucosa sobre la incorporación de citrato-1,5- C^{14} en lípidos de granulocitos humanos.

TABLA II

INCORPORACION DE CITRATO-1,5- C^{14} EN FRACCIONES LIPIDICAS DE GRANULOCITOS MADUROS INTACTOS

Fracción	nmoles x 2 h ⁻¹ x 10 ¹⁰ cel ⁻¹
Saponificable	840 ± 167* (6)
No saponificable	220 ± 95 (6)

* Valor promedio ± D.S. del número de experimentos entre paréntesis.

Actividad de la citrato liasa.— Para la determinación de esta enzima citosólica fué importante lograr una lisis completa de las células blancas; lo que se logró mediante el uso, como medio de homogenización, de sacarosa más heparina. La simple homogenización en sacarosa o buffer, no produjo sino una ruptura parcial de las células blancas, con muy poca liberación del citosol. La concentración de proteínas obtenida por nosotros, en la fracción usada para la determinación enzimática (sobrenadante de 100.000 g) fué de 2-4 mg por ml. Esta enzima está presente en esta fracción, con una actividad de 1,51 nanomoles por minuto por mg de proteína (Tabla III).

TABLA III

ACTIVIDAD DE CITRATO LIASA EN FRACCION CITOSOLICA DE GRANULOCITOS HUMANOS MADUROS

Exp. N°	Actividad enzimática (nmoles x min ⁻¹ x mg ⁻¹) (*)
1	0,54
2	2,30
3	1,60
4	1,60
Promedio	1,51
D.S.	± 0,73

(*) Proteínas en sobrenadante de 100.000 g.

DISCUSION

Cuando se incuban células enteras con citrato- 1,5- C¹⁴, el marcaje de los lípidos sintetizados a partir de este compuesto es sólo posible si éste es escindido directamente en el compartimiento citosólico por acción de la citrato liasa, formando acetil CoA a partir del carbono 1 (8, 22). El citrato no utilizado por la liasa podría entrar a la mitocondria y ser metabolizado; pero ninguno de los dos carbonos marcados contribuiría, en forma importante, a formar radicales acetilo, que podrían ser incorporados a los lípidos a través de otras rutas (Fig. 4).

Nosotros encontramos que existe una activa síntesis de lípidos a partir de citrato como precursor, la cual es lineal con respecto al tiempo, concen-

tración de sustrato y cantidad de células usadas. El hecho de haber encontrado que un 75% de la radioactividad total incorporada en los lípidos extraídos, se encuentra en la fracción saponificable, nos demuestra que ésta se haya localizada primordialmente en los ácidos grasos y no en otros radicales, como el glicerol.

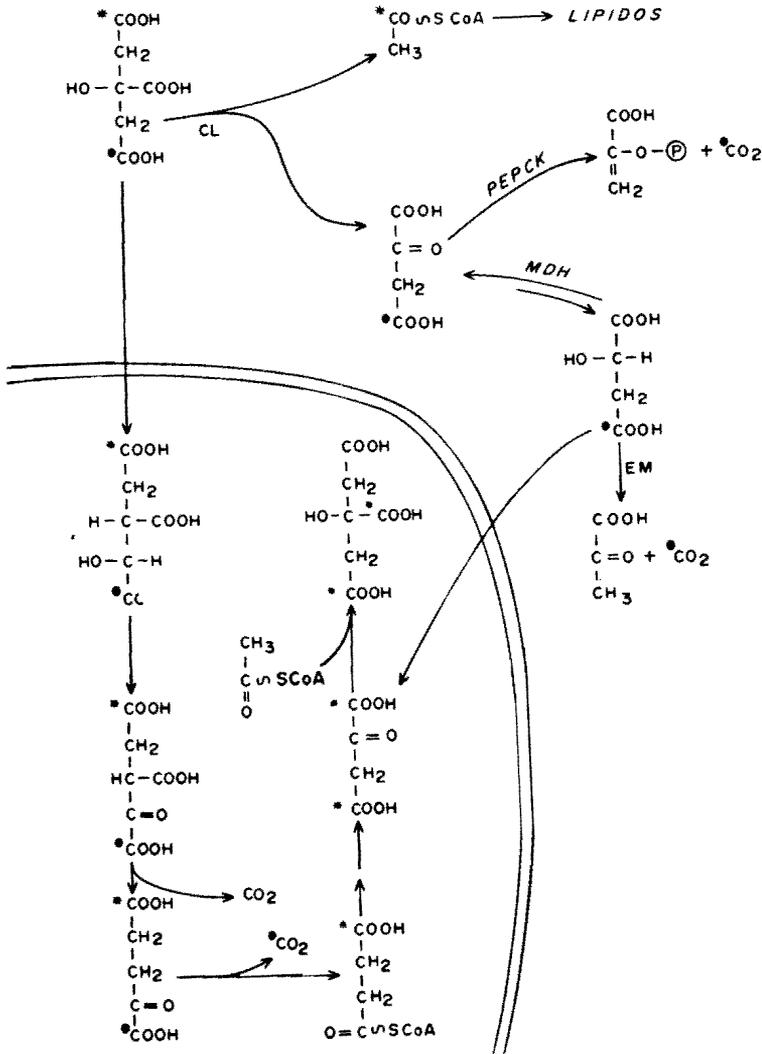


Fig. 4.— Ruta del citrato-1,5-C¹⁴ al penetrar en la célula. CL = ATP-citrato liasa; PEPCK = fosfoenolpiruvato carboxi-quinasa; MDH = dehidrogenasa málica; EM = enzima málica.

Se tiene establecido que el acetil CoA que se utiliza para la síntesis de novo de los ácidos grasos, debe provenir principalmente de la escisión del citrato por la liasa, ya que esta enzima es adaptativa, al igual que la carboxilasa; sus actividades se modulan con los cambios observados en la lipogénesis (si bien es cierto que también se admite que el pool de acetil CoA extramitocondrial es uno solo).

Al medir la actividad de la liasa en los granulocitos aislados, nos encontramos que está presente con una actividad de 1,51 nanomoles por min por mg de proteína. Si comparamos esta actividad encontrada por nosotros en los granulocitos, con las actividades de las enzimas lipogénicas reportadas en la literatura para otros órganos (2, 12, 13, 21, 23, 24) (Tabla IV), podemos concluir que es apreciable, sobre todo si proviene de humanos, cuyos tejidos presentan actividades enzimáticas relativamente más bajas; y si la actividad de la sintetasa leucocitaria es igual a la de las plaquetas, donde se considera que la síntesis de novo es importante (13), podemos asumir que la vía de la citrato liasa es activa en los granulocitos, para la producción del acetil CoA extramitocondrial.

TABLA IV

**COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS LIPOGENICAS
EN ALGUNOS TEJIDOS**

	Citrato liasa (nmoles x min ⁻¹ x mg ⁻¹)	Carboxilasa	Sintetasa
Hígado de rata (2, 23, 24)	10-18	0,42	3,5
Hígado humano (13, 21)	2,8	0,33	1,53
Plaquetas humanas (13)		0,036	0,075
Leucocitos humanos inmaduros (12)		0,005	0,125
Leucocitos humanos maduros (12)	1,51*		0,067

* Resultados del presente trabajo.

El no haberse podido medir aún la carboxilasa, enzima clave de esta vía, creemos se deba a la dificultad que existe para la desintegración completa de la célula blanca y para la obtención de una buena fracción citosólica que proporcione suficiente cantidad de enzima para poder medirla. Majerus y Lastra (12) refieren que, en leucocitos inmaduros, la actividad de esta enzima es de apenas 5 picomoles por mg de proteína. Se reporta (1, 9) y nosotros lo hemos observado en nuestro laboratorio, que los métodos convencionales de disrupción celular no son efectivos

con los leucocitos. Es necesario el uso de heparina para lograr romper la célula y liberar el contenido citosólico.

Si bien en ausencia de glucosa en el medio de incubación, los valores obtenidos para la síntesis grasa a partir de citrato, son bastantes más bajos que los que se obtienen cuando se usa acetato como precursor, estos valores suben considerablemente a medida que se eleva la concentración de glucosa en el medio; lo que nos hace suponer que esta vía puede jugar un papel importante en aquellas situaciones asociadas con hiperglicemias.

Se conoce que el paso de la glucosa a los granulocitos es una difusión pasiva (10), porque no hay curva de saturación ni es influenciada por la insulina. Sin embargo, la insulina aumenta el consumo de glucosa, probablemente activando uno de los pasos claves de la glicólisis (10). En nuestra preparación, en ausencia de insulina, la incorporación fué un 17% inferior a la observada cuando la hormona estuvo presente en el medio de incubación. En las plaquetas también se ha observado un efecto estimulante de la glucosa sobre la síntesis grasa (20, 28); que es máximo a concentraciones fisiológicas (2-5 mM), pero usando acetato como precursor. Este efecto parece estar mediado por un aumento de la capacidad glicolítica, ya que es abolido por inhibidores de la glicólisis (28).

El que un aumento en la concentración de glucosa, la cual entra sin barreras a la célula blanca, favorezca la síntesis grasa (obteniéndose valores importantes), y que la insulina estimule su consumo, traería como consecuencia un incremento en la concentración intracelular de citrato "frío", el cual afectaría nuestros resultados introduciendo un factor de dilución. También merece destacarse el hecho de que, siendo una reacción dependiente de la concentración de citrato en el medio de incubación, y siendo este compuesto de difícil penetración a la célula, la cantidad de citrato que penetra no es suficiente para medir esta vía en todo su potencial; lo que es agravado por la dilución que mencionamos anteriormente.

Así, las cifras obtenidas por nosotros, serían subestimaciones de los valores reales, y por lo tanto, la vía de la citrato liasa podría ser mucho más importante para la síntesis grasa, de lo que aparentemente parece ser.

Agradecimientos

Al Dr. Alonso Núñez Montiel, Director del Banco de Sangre de Maracaibo, por su colaboración para la recolección de las muestras. Al Técnico Químico Gilberto Campos, por su eficiente ayuda técnica. Al Dr. J. L. Avila Bello por la discusión crítica del manuscrito y sus valiosas sugerencias.

Parte de este trabajo fue presentado en la 67a. Reunión Anual de la ASBC, San Francisco, Calif., U.S.A., junio 1976 y XXVI Convención Anual de la ASOVAC, Pto. La Cruz, Venezuela, en noviembre 1976.

ABSTRACT

Role of the citrate lyase in lipid biosynthesis in human granulocytes.
Ryder E., Martinucci D. (Instituto de Investigación Clínica, Apartado 1151, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela).
Invest. Clín. 18(2): 108-122, 1977. – Incorporation of 1,5-¹⁴C-citrate into the saponifiable fraction of a lipid extract from human granulocytes is indicative of the operativeness of the citrate pathway as precursor of acetyl units in those cells. The incorporation is dependent on glucose concentration in the incubation media, and, under certain circumstances, it becomes quite important compared to the acetate incorporation under the same conditions. The presence of cytosolic citrate lyase with an activity of 1,51 nmoles per min per mg of protein, confirms the presence of that pathway in human granulocytes.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1– AVILA JL, CONVIT J: Studies on human polymorphonuclear leukocyte enzymes. I. Assay of acid hydrolases and other enzymes. *Biochem Biophys Acta* 293: 397-408, 1973.
- 2– BALLARD FJ, HANSON RW: Changes in lipid synthesis in rat liver during development. *Biochem J* 102: 952-958, 1967.
- 3– EHRHART LA, BALACHANDRAN R, BUTKUS A, LEWIS LA, LAZZARINI ROBERTSON A: Lipid Metabolism of acetate-1-¹⁴C by leukocytes from dogs fed an arteriosclerosis-inducing diet. *Lipids* 6: 895-900, 1971.
- 4– ELSBACH P: Composition and synthesis of lipids in resting and phagocytizing leukocytes. *J Exp Med* 110: 969-980, 1959.
- 5– FOLCH J, LEES H, and SLOANE STANLEY GH: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509, 1957.
- 6– HULSMANN WC, OEI TL, VAN CREVELD S: Phosphorylase activity in leukocytes from patients with glycogen storage disease. *Lancet* 2: 581-583, 1961.

- 7- KAMPINE JP, BRADY RO, KANFER JN, FIELD M, SHAPIRO D: Diagnosis of Gaucher's disease and Niemann-Pick disease with small samples of venous blood. *Science* 155: 86-88, 1967.
- 8- KATHER H, BRAND K: Origin of hydrogen required for fatty acid synthesis in isolated rat adipocytes. *Arch Biochem Biophys* 170: 417-426, 1975.
- 9- KIMBALL HR, FORD GH, WOLFF SM: Lysosomal enzymes in normal and Chediak-Higashi blood leukocytes. *J Lab Clin Med* 86: 616-630, 1975.
- 10- LEROUX JP, MARCHAND JC, HONG TUAN HAR, CARTIER P: The influence of insulin on glucose permeability and metabolism of human granulocytes. *Eur J Biochem* 58: 367-373, 1975.
- 11- LOWRY O, ROSEBROUGH N, LEWIS A, RANDALL R: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
- 12- MAJERUS PW, LASTRA R: Fatty acid biosynthesis in human leukocytes. *J Clin Invest* 46: 1596-1602, 1967.
- 13- MAJERUS PW, SMITH MB, CLAMON GH: Lipid metabolism in human platelets. I. Evidence for a complete fatty acid synthesizing system. *J Clin Invest* 48: 156-164, 1969.
- 14- MALAMOS B, MIRAS C, LEVIS G, MANTZOS J: The in vitro incorporation of acetate-1-¹⁴C into normal and leukemic leukocyte lipids. *J Lipid Res* 3: 222-228, 1962.
- 15- MARKS PA, GELLHORN A, KIDSON C: Lipid synthesis in human leukocytes, platelets, and erythrocytes. *J Biol Chem* 235: 2579-2583, 1960.
- 16- MIRAS CJ, MANTZOS JD, LEVIS GM: Fatty acid synthesis in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 19: 79-83, 1965.
- 17- NESSI P, BILLESBOLLE S, FORNEROD M, MAILLARD M, FREI J: Leucocyte energy metabolism. VII. Respiratory chain enzymes, oxygen consumption and oxidative phosphorylation of mitochondria isolated from leucocytes. *Enzyme* 22: 183-195, 1977.
- 18- PERCY AK, BRADY RO: Metachromatic leukodystrophy: diagnosis with samples of venous blood. *Science* 161: 594-595, 1968.
- 19- SBARRA AJ, KARNOVSKY ML: The biochemical basis of phago-

cytosis. II Incorporation of C¹⁴-labeled building blocks into lipid, protein, and glycogen of leukocytes during phagocytosis. *J Biol Chem* 235: 2224-2229, 1960.

- 20- SCHMUKLER M, ZIEVE PD: The effect of glucose feeding on fatty acid synthesis in human platelets. *J Lab Clin Med* 80: 231-235, 1972.
 - 21- SHRAGO E, GLENNON JA, GORDON ES: Comparative aspects of lipogenesis in mammalian tissues. *Metabolism* 20: 54-62, 1971.
 - 22- SPENCER A, LOWENSTEIN J: The supply of precursors for the synthesis of fatty acids. *J Biol Chem* 237: 3640-3648, 1962.
 - 23- SRERE PA: The citrate cleavage enzyme. I. Distribution and purification. *J Biol Chem* 234: 2544-2547, 1959.
 - 24- SRERE PA: Some complexities of metabolic regulation. *Biochem Med* 3: 61-72, 1969.
 - 25- WEIR GC, MARTIN DB: Fatty acid biosynthesis in the erythrocyte. II. Evidence in immature erythrocytes for the presence of acetyl coenzyme A carboxylase. *J Lab Clin Med* 81: 37-42, 1973.
 - 26- WILLIAMS HS, FIELD JB: Low leukocyte phosphorylase in hepatic phosphorylase deficient glycogen storage disease. *J Clin Invest* 40: 1841-1845, 1961.
 - 27- WILLIAMS HE, KENDIG EM, FIELD JB: Leukocyte debranching enzyme in glycogen storage disease. *J Clin Invest* 42: 656-660, 1963.
 - 28- ZIEVE PD, SCHMUKLER M: Stimulation by glucose of fatty acid synthesis in human platelets. *Am J Physiol* 219: 1009-1013, 1970.
-