

ANÁLISIS DE HUELLAS METABÓLICAS EN MUESTRAS DE PACIENTES ENFERMOS DEL VIRUS DENGUE POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.

Leidy V. Mena y Julien Wist*

Departamento de Química, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

PALABRAS CLAVES. Dengue, Huellas metabólicas, RMN, PCA, OPLS-DA.

RESUMEN: El dengue es una enfermedad viral, transmitida por mosquitos *Aedes aegypti*, el vector más importante en términos de morbilidad, mortalidad y afectación económica. En Colombia, ésta enfermedad tropical representa un problema prioritario en Salud Pública, manifestando variables signos y síntomas que no son característicos, por lo cual se pueden confundir con patologías dentro de los síndromes febriles, presentando un cuadro clínico indefinido. Mediante la implementación de nuevas herramientas que permitan identificar las perturbaciones de los procesos metabólicos y revelar la variedad de rasgos de la infección, es posible la creación de modelos de diagnóstico en etapas tempranas. El análisis de huellas metabólicas, obtenidas por RMN, con estadística multivariada; PCA y OPLS-DA, revelaron diferencias en muestras de suero y plasma de pacientes infectados con el virus dengue ($n = 92$), que permitieron distinguir entre la fase aguda y la fase de recuperación. Tres metabolitos fueron identificados; lactato, lípidos y un metabolito no identificado, mediante OPLS-DA ($R^2_X = 0.678$ y $Q^2 = 0.592$).

INTRODUCCIÓN

El virus del dengue es una enfermedad viral, de carácter endémo-epidémico, transmitida por mosquitos del género *Aedes*, principalmente por *Aedes aegypti*, el cual constituye el vector más importante en términos de morbilidad, mortalidad y afectación económica.¹

Esta enfermedad tropical es considerada sistémica y muy dinámica, en la que un paciente puede pasar de un cuadro clínico leve a un cuadro clínico grave de manera súbita.

El dengue se manifiesta mediante la presencia de variables signos y síntomas que no son característicos, por lo cual se pueden confundir con patologías dentro de los síndromes febriles hemorrágicos, como el paludismo, dengue, fiebre amarilla, hepatitis, influenza y leptospirosis.¹ El curso de la enfermedad pasa por tres etapas clínicas: la fase febril o fase aguda (la única para la mayoría de los enfermos), la fase crítica, y la etapa de recuperación.^{2,3}

En Colombia, ésta enfermedad es prioritaria en Salud pública, por lo cual es necesario proporcionar nuevos conocimientos sobre los mecanismos bioquímicos de la enfermedad, y poder abrir paso hacia la creación de nuevos modelos que permitan realizar diagnósticos en etapas tempranas de la infección. Un camino, es mediante el estudio de los metabolitos, ya que estos, como especies independientes, podrían pasar a formar la base de biomarcadores empleados en los estudios clínicos.⁴

La metabolómica es una disciplina de las ciencias ómicas, la cual tiene como objetivo, estudiar los cambios globales de metabolitos en sistemas biológicos, en respuesta a estímulos o perturbaciones, tales como el consumo de

fármacos, la dieta, el estilo de vida, el medio ambiente y las enfermedades. Los metabolitos son los productos finales de los procesos de regulación celular, formando un enlace entre los cambios moleculares y fenotípicos, reflejando el estado fisiológico de una célula, tejido u organismo.⁵ Los estudios metabolómicos (metabonomía a menudo se utiliza como sinónimo, cuya definición original es “la medición cuantitativa de la respuesta metabólica multiparamétrica dinámica de los sistemas vivos a los estímulos fisiopatológicos o modificación genética” por Nicholson et al.⁶) generalmente usan biofluidos (plasma, suero, saliva o heces) o extractos de células o tejidos, como fuentes primarias de datos metabólicos.⁷

La técnica de Perfiles Metabólicos es una estrategia que permite analizar el metaboloma en un momento dado, revelando diferencias entre las huellas metabólicas, y ampliando la comprensión bioquímica de las enfermedades, al identificar nuevos biomarcadores que puedan delatar las causas o mecanismos de la misma. La espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN), son las técnicas analíticas de mayor utilidad para la obtención de estas huellas metabólicas.

El análisis e interpretación de los conjuntos de datos espectrales, requiere métodos estadísticos multivariados; se encuentran los métodos no supervisados y supervisados. Los métodos sin supervisión como análisis de componentes principales (PCA), se utilizan para verificar la integridad de los datos, detectar los valores atípicos, y para determinar si existe alguna agrupación dentro de un conjunto de datos, sin un conocimiento *a priori* de la clase de

muestra⁸. Mientras, los métodos supervisados como mínimos cuadrados parciales ortogonales con análisis discriminante (OPLS-DA), utilizan un conjunto de entrenamiento para el cual las clases son conocidas, para luego predecir las clases de un conjunto de prueba.

La metabolómica, se está utilizando actualmente para comprender las causas subyacentes de ciertas enfermedades, identificando biomarcadores. Mediante la técnica de RMN, se reportan estudios en la tuberculosis, la malaria, la neumonía, diferentes tipos de cáncer, parkinson, trastornos neurológicos, y numerosas otras enfermedades humanas, según los reportes de Gebregiorgis, T, et al.⁹ Birungi et al.¹⁰, estudiaron los efectos de la infección por dengue en la línea celular EA.hy926 mediante un enfoque multianalítico de ¹H-NMR y LC-MS, donde los resultados obtenidos revelaron huellas metabólicas que se pueden atribuir a los serotipos específicos del dengue y a variaciones en las cantidades de ciertos metabolitos, como aminoácidos, ácidos grasos, ácidos cetónicos, ácidos indolacéticos, acilglicinas, y colesterol. La infección del dengue parece afectar el metabolismo de los aminoácidos y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, relacionándose además con la ω -oxidación de los ácidos grasos. Bernardo¹¹, logró diferenciar muestras de plasma de pacientes infectados con el virus dengue y controles sanos, mediante análisis de huellas metabólicas obtenidas por RMN, encontrando disminución en los niveles de citrulina y prolina, combinado con un nivel constante de arginina, el cual parece ser una posible manera de identificar el dengue, encontrándose estos resultados asociados a determinadas vías de producción de óxido nítrico (NO), una respuesta común a las infecciones virales, en donde se ha demostrado que los pacientes de dengue han aumentado los niveles de NO¹². Cui et al.⁵, realizaron la caracterización del metaboloma y lipidoma, en muestras de suero de pacientes adultos con infección primaria de dengue, en la etapa febril, en la etapa de desaparición de la fiebre, y en la etapa de convalecencia de la infección, mediante LC-MS y GC-MS. Para ello se concentraron en estudiar concentraciones de compuestos lipídicos, reportando un amplio mapa de los cambios fisiológicos en pacientes adultos con DF (fiebre del dengue), a través del cual identificaron las vías metabólicas alteradas vinculadas a la infección del dengue, cambios dinámicos de los metabolitos en cada una de las etapas estudiadas, y el descubrimiento de metabolitos diferenciales fiables que se asocian estrechamente con la fisiopatología del dengue, encontrando 200 metabolitos en suero que cambiaron de manera significativa, de los cuales 60 fueron identificados.

En el presente estudio, se aplicó la técnica de RMN y métodos multivariados, para la obtención y análisis de huellas metabólicas, en muestras de suero/plasma de pacientes infectados con virus dengue, revelando diferencias entre las fases de la enfermedad.

METODOLOGÍA

Se analizaron muestras de suero y plasma de pacientes enfermos con virus dengue, pacientes en la fase aguda y en la fase de recuperación, mediante experimentos ¹H-NMR.

Las muestras se obtuvieron de los bancos de muestras del grupo de investigación Virus Emergentes y Enfermedad (VIREM) de la Universidad del Valle, las cuales fueron seleccionadas de tres diferentes tipos de estudios, en condiciones no controladas y crio preservadas durante menos de 13 años a -80°C. Se seleccionaron dos conjuntos de pacientes; uno en el cual se tienen dos muestras por paciente: muestra en la fase aguda y muestra en la fase de recuperación, (n = 79); y otro conjunto con muestra única del paciente en la fase aguda (n = 13). En ambos casos se conocía el diagnóstico del dengue (dengue signos de alarma, dengue clásico y dengue grave), los días de la enfermedad (fase aguda, entre los primeros 7 días, y fase de recuperación, después del día 15 de la enfermedad), el género (32 hombres y 20 mujeres) y la edad del paciente (entre los 2 y 62 años).

Cada muestra (350 μ L) se descongeló a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000g a 4°C durante 5 min. Se adicionó 350 μ L de Buffer de Fosfato pH 7.4 (0.075M Na₂HPO₄·7H₂O) preparado con D₂O y TSP y se centrifugó nuevamente a 12000g a 4°C durante 5 min. Finalmente, 600 μ L de sobrenadante se transfirió a tubo de RMN de 5mm.

Espectros ¹H-RMN fueron adquiridos en espectrómetro Bruker Avance II Ultra Shield de 400 MHz con sonda directa BBO equipada de 3 gradientes a una temperatura de 300 K. Los espectros se obtuvieron mediante la secuencia de pulsos CPMG a 64 *scans* y con pre-saturación de la señal del agua. Mediante la secuencia CPMG se logra eliminar del espectro las señales pertenecientes a moléculas de elevado peso molecular, mejorando la resolución de las señales correspondientes a los metabolitos. La frecuencia de resonancia y la homogeneidad del campo se ajustaron de manera automática, mientras que la calibración de la supresión del solvente se realizó de manera manual para cada muestra. Cada espectro se referenció con respecto a la resonancia del doblete de α -glucosa a δ 5.233 ppm en TopSpin 2.5 (Bruker Biospin A.G. Rheinstetten, Germany).

La matriz de datos espectrales fue pre-procesada con secuencias de comandos en software R (R Development-Core Team); se eliminaron las regiones de las señales de TSP, agua y anticoagulantes, así como las regiones espectrales de los extremos; y finalmente se realizó *binning* en la región espectral comprendida entre δ 0.1 – 9.0 ppm.

Para el análisis de los datos espectrales se emplearon métodos multivariados; se aplicó PCA y OPLS-DA en software SIMCA 14.1 (Umetrics, Umeå, Sweden), usando pareto como método de escalado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de las muestras de los pacientes, 59 eran de suero y 33 de plasma; 3 contenían anticoagulante citrato y 30 anticoagulante EDTA.

La presencia de estos anticoagulantes generó tanto un grado de solapamiento en ciertas regiones del espectro, como interacción con los iones libres de calcio y magnesio presentes en las muestras (figura 1); causando perturbaciones en las huellas metabólicas, al introducir señales adicionales y afectando otras, mediante interacciones

moleculares entre los anticoagulantes y los componentes del plasma.
En la tabla 1 se reportan las resonancias de las señales ^1H -RMN que generan los anticoagulantes en las muestras de

plasma de los pacientes. Estas señales fueron asignadas con base a lo reportado por Barton et al.¹³

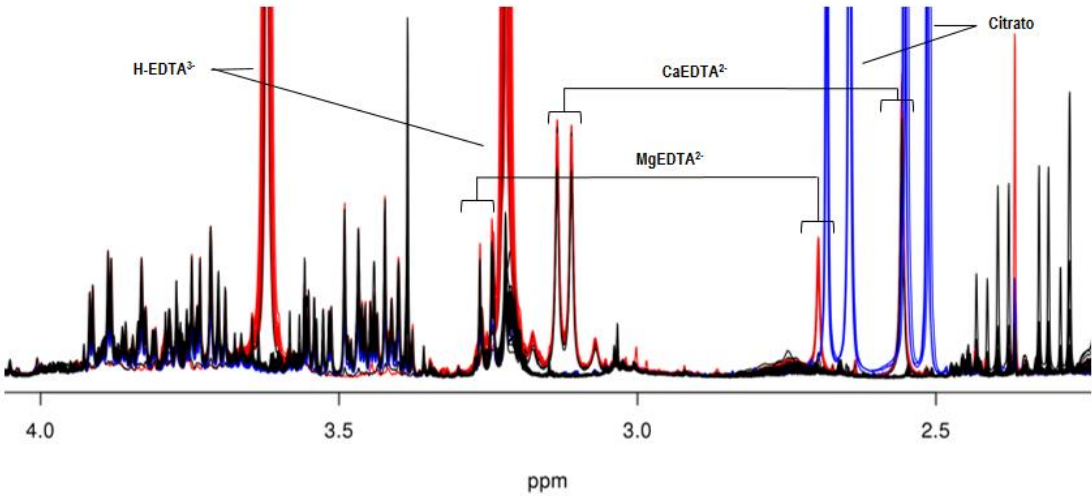


Figura 1. Perfil metabólico (recortado entre 4.0 y 2.3 ppm) ^1H -RMN en donde se observan las señales generadas por los anticoagulantes. En negro, los espectros de muestras de suero sin anticoagulante; en rojo, con anticoagulante EDTA; y en azul, con anticoagulante citrato.

Tabla 1. Resonancias provenientes de las señales de EDTA y citrato en las muestras de plasma de los pacientes.

Señal	δ ^1H -RMN (ppm)
Citrato	2.54 (d)
	2.68 (d)
H-EDTA ³⁻	3.20 (s)
	3.60 (s)
MgEDTA ²⁻	2.76 (s)
	3.23 (d)
CaEDTA ²⁻	2.57 (s)
	3.13 (d)

Las regiones del espectro que no contenían información metabólica fueron eliminadas antes de realizar el análisis; las señales del agua (δ 4.67 – 5.19 ppm), del TSP (δ -0.2 – 0.1 ppm), de los anticoagulantes (δ 2.49 – 2.71, 3.04 – 3.29 y 3.59 – 3.68 ppm) y de los extremos (> 0.1 y < 9 ppm)

fueron excluidas. Sin embargo se alteró la información de la glucosa en δ 3.59 – 3.68 ppm y en δ 3.20 – 3.30 ppm, a causa de las señales de EDTA libre en δ 3.60 y 3.20 ppm y de un doblete de MgEDTA^{2-} en δ 3.23 ppm. Se logró la identificación de varios metabolitos en los espectros ^1H -RMN de las muestras de suero/plasma de los pacientes (figura 2) mediante el software Chenomx NMR Suite 8.1, comparándose con los resultados reportados por Misra y Bajpai.¹⁴ En varias regiones del espectro se observaron señales de pequeñas moléculas solapadas, debido a la presencia de señales muy anchas de las macromoléculas de ácidos grasos, ubicadas principalmente en δ 0.86, 1.28-1.31 y 2.04 ppm. En la tabla 2 se reportan las resonancias de las señales ^1H -RMN que generan los metabolitos identificados en los espectros ^1H -RMN de las muestras de los pacientes.

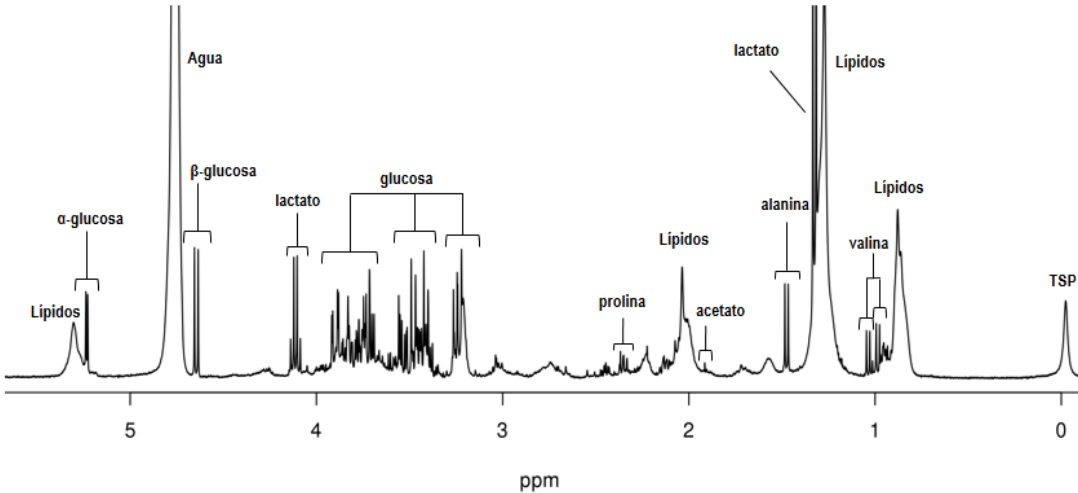


Figura 2. Espectro ^1H -RMN de una muestra de suero humano sano.

Tabla 2. Resonancias ^1H -RMN de metabolitos en espectro de suero humano.

Señal	δ ^1H -RMN (ppm)
Valina	0.98 (d)
	1.04 (d)
Lactato	1.33 (d)
	4.11 (c)
Alanina	1.47 (d)
Acetato	1.91 (s)
Prolina	2.35 (m)
Glucosa	3.2 – 3.9 (m)
β -glucosa	4.64 (d)
α -glucosa	5.23 (d)

Para evaluar la calidad y el agrupamiento de los datos, la matriz pre-procesada fue factorizada en sus componentes principales, detectando los valores atípicos dentro de cada conjunto de datos, mediante la proyección de las puntuaciones obtenidas con la elipse T^2 de Hotelling para el 95%. Del conjunto total de datos espectrales (92), 53 de fase aguda y 39 de fase de recuperación, se identificaron 8 datos atípicos (6 y 2, respectivamente), los cuales fueron excluidos de la matriz. Su comportamiento estadístico distinto, podría haber sido causado por la evidencia de alguna alteración metabólica diferente a los demás perfiles, posiblemente a causa de una patología adicional. Se observaron alteraciones drásticas en las regiones de la glucosa (δ 5.23, 4.64 y 3.2 – 3.9 ppm) y en la región no identificada de δ 1.2 – 1.1 ppm. En la figura 3 se presentan dos ejemplos.

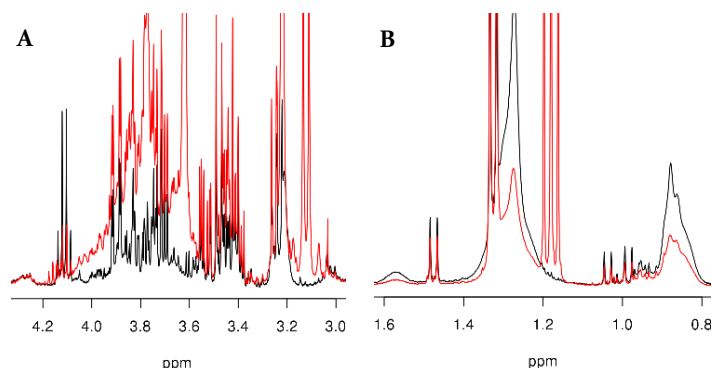


Figura 3. Comparación de espectros (parcial) ^1H -RMN de muestras de pacientes donde se observan las diferencias más significativas entre los datos atípicos (rojo) y las muestras incluidas (negro). (A) región de la glucosa, δ 3.2 – 3.9 ppm y (B) región no identificada, δ 1.2 – 1.1 ppm.

Se realizó PCA a la matriz de 84 espectros restantes, y se evaluó si existía algún patrón debido a la fase de la enfermedad. La gráfica de puntuaciones, obtenida con las dos primeras componentes principales, presentó 42 y 15% de varianza, respectivamente (figura 4.A), observando una leve tendencia en la dirección del segundo componente principal, pero pobre separación de las clases, a causa de la gran heterogeneidad que presentan las muestras biológicas de humanos, en donde el metabolismo y los cambios fisiológicos, son el resultado de interacciones complejas entre los genes, el microbioma y el medio ambiente.¹⁵ OPLS-DA, la cual es una herramienta de clasificación más rigurosa, efectiva por ser supervisada, permitió en cambio, revelar una clara segregación entre las dos fases de la

enfermedad (figura 4.B); representando en el primer componente predictivo, la variación entre los grupos; y en el componente predictivo ortogonal, la variación dentro de los grupos. La calidad del modelo fue evaluado por los parámetros $R^2_X = 0.678$ y $Q^2 = 0.592$, indicando un buen ajuste y predicción.

La validez de los resultados obtenidos, se evaluó mediante permutación, en la cual se comparan los valores de ajuste y predicción del modelo original, con varios modelos basados en la permutación aleatoria de las clases. Para 20 permutaciones, se obtuvo un valor de $R^2 = 0.522$ y $Q^2 = -0.674$, validando los resultados originales, ya que R^2 se mantiene menor al del modelo original, y Q^2 se encuentra menor a cero.

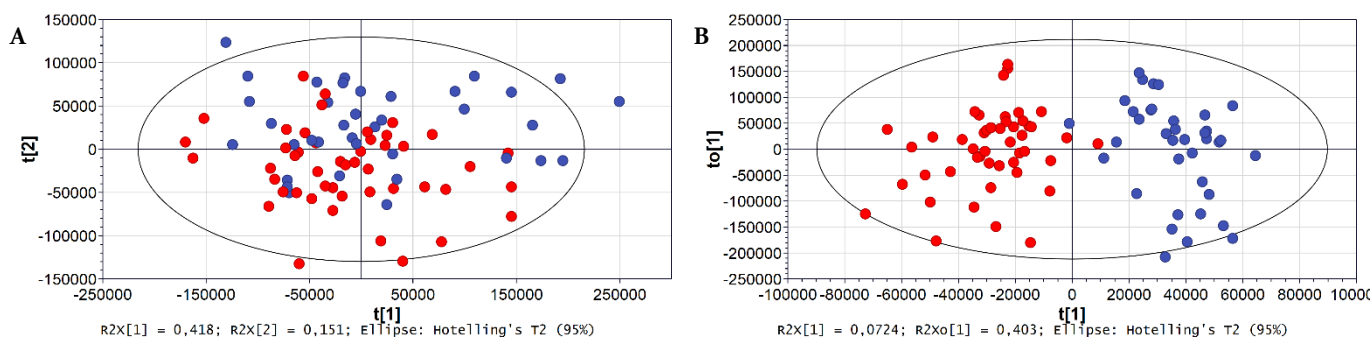
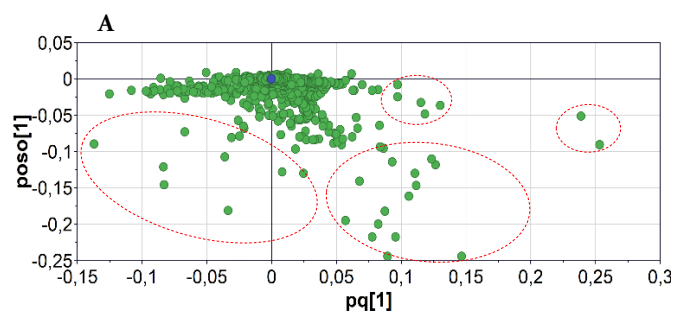


Figura 4. Gráficos de puntuaciones de fase aguda (rojo) vs. fase de recuperación (azul) basado en los datos metabolómicos obtenidos por RMN de las muestras de los pacientes. (A) PCA y (B) OPLS-DA.

Los gráficos de cargas y S-plot del modelo (figura 5) OPLS-DA, permitieron mostrar las variables que contribuyeron de manera significativa a la discriminación de las clases, donde las variables ubicadas en los extremos son



las que más contribuyeron a la separación de los grupos en el gráfico de puntuaciones.

Se identificaron varios bins correspondientes a δ 0.86, 1.28, 1.33, 2.04, 3.39 y 4.11 ppm.

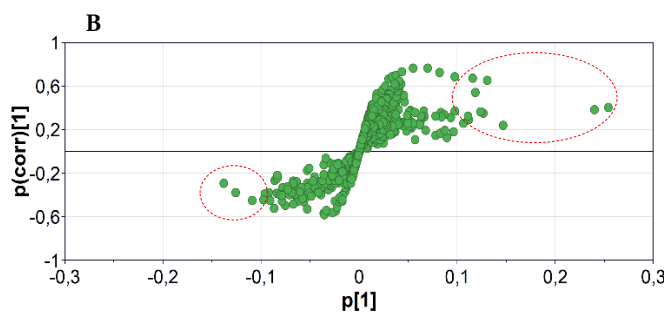


Figura 5. (A) Gráfico de cargas y (B) S-plot correspondientes al OPLS-DA para la clasificación del virus dengue en fase aguda y fase de recuperación. Cada punto en las gráficas representa un bin. Las variables seleccionadas se muestran mediante círculos rojos de líneas punteadas.

El análisis de las huellas metabólicas muestra alteración en los niveles de lípidos (figura 6.A-C), lactato (figura 6.B y E) y un metabolito no identificado (figura 6.D), siendo una posible manera de identificar la infección del dengue. Estos resultados pueden estar asociados a determinadas

vías metabólicas del huésped, que son críticas para el ciclo de vida del virus. Heaton, N. S., et al.¹⁶ reporta que las alteraciones en el metabolismo de lípidos son autofagia dependiente y necesarias para la replicación del virus dengue.

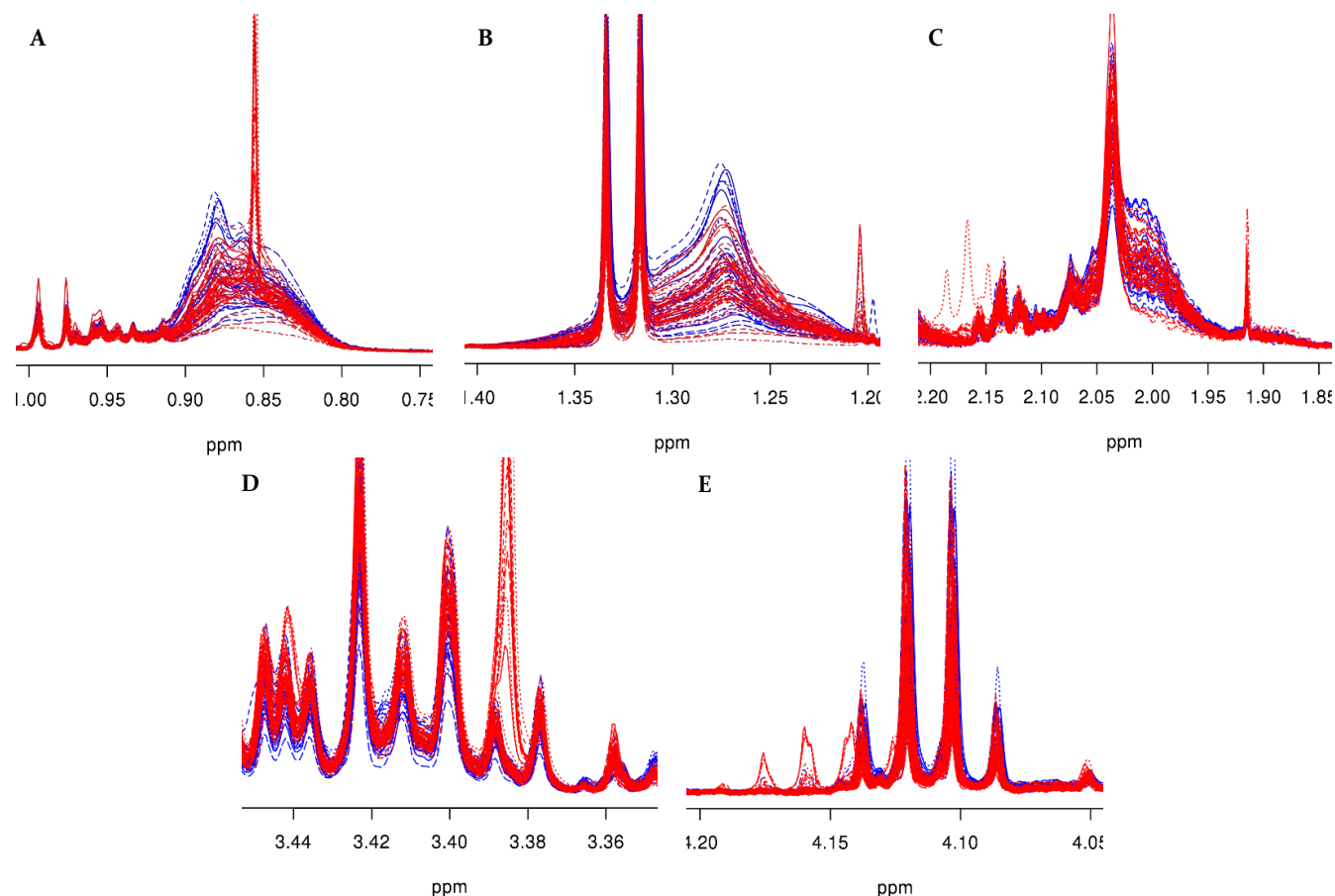


Figura 6. Regiones de mayor variación de los perfiles metabólicos ^1H -RMN de las muestras de pacientes en la fase aguda (rojo) y en la fase de recuperación (azul). (A) δ 0.86 ppm lípidos, (B) δ 1.28 ppm lípidos y δ 1.33 ppm lactato (doblete), (C) δ 2.04 ppm lípidos, (D) δ 3.39 ppm metabolito no identificado y (E) δ 4.11 ppm lactato (cuartete).

Las muestras de los pacientes en la fase aguda estaban caracterizadas a su vez, según el diagnóstico de dengue: dengue clásico, dengue signos de alarma y dengue grave.

El gráfico de puntuaciones del PCA (figura 7), permitió mostrar que existen diferencias apreciables entre los distintos diagnósticos del dengue en la fase aguda, donde la separación más evidente fue entre la fase aguda-dengue

grave (color violeta) y la fase de recuperación (color azul). Por lo tanto, se esperaba que la mayor contribución de las variables discriminantes en el modelo OPLS-DA se debiera a los perfiles metabólicos de las muestras de dengue

grave, donde en la figura 6, la alteración de los metabolitos en cada caso, se debió en mayor proporción a la fase aguda-dengue grave.

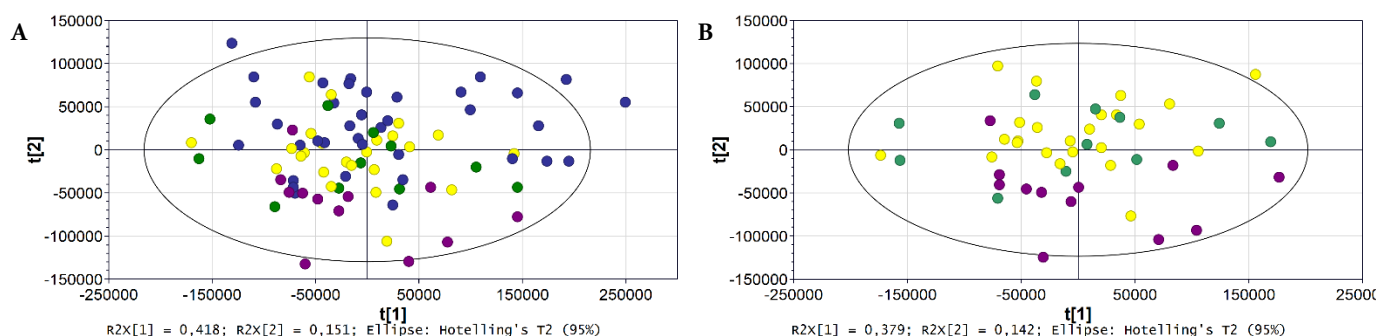


Figura 7. Gráfico de puntuaciones del PCA según el diagnóstico del virus dengue en las muestras (A) fase de recuperación y fase aguda (dengue clásico, dengue signos de alarma y dengue grave) (B) fase aguda (dengue clásico, dengue signos de alarma y dengue grave). Fase de recuperación (azul), dengue clásico (verde), dengue signos de alarma (amarillo) y dengue grave (violeta).

CONCLUSIONES

El enfoque metabolómico por ^1H -RMN, combinado con métodos multivariados, permitió analizar las huellas metabólicas de muestras de pacientes infectados con virus dengue, pese a la pérdida de información de algunas regiones espectrales a causa de la presencia de anticoagulantes. Se identificaron estadísticamente tres metabolitos diferenciales, sustentados a su vez bioquímicamente, gracias a los reportes de algunos autores, que explican la alteración de ciertas vías metabólicas del huésped, en pro de la replicación eficiente del virus.

Se propone continuar investigando los cambios metabólicos subyacentes de la infección del virus dengue, mediante la obtención de perfiles metabólicos en estudios longitudinales, que permitan evaluar el progreso de la infección durante distintas fases, así como la diferenciación entre los diferentes diagnósticos del dengue.

Nota adicional: La selección de las muestras de los pacientes; suero, plasma con EDTA y plasma con citrato no fue decisión de los investigadores; desde el inicio de todo el proceso se planteó trabajar con muestras de suero, debido a que se tenía conocimiento previo de las interferencias que causaban los anticoagulantes en el análisis. La calidad de las muestras fue descubierto solo hasta iniciado los experimentos por RMN.

INFORMACIÓN DEL AUTOR

Autor para la correspondencia

* julien.wist@correounivalle.edu.co

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al grupo de Investigación VIREM de la Universidad del Valle, a la profesora Beatriz Parra, y a la profesora Lyda Osorio, por proveer las muestras de los pacientes enfermos con virus dengue.

ABREVIACIONES

CPMG, Carr-Purcell-Meiboom-Gill;

REFERENCIAS

- (1) Instituto Nacional de Salud (INS), Organización Panamericana de Salud (OPS) & Organización Mundial de Salud (OMS). 2010, Colombia. Guía Atención Clínica Integral del Paciente con Dengue. <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Dengue/o2%20Clinica%20Dengue.pdf> (visitado el 28 de febrero de 2016).
- (2) Martínez, E. Dengue. *Estudios Avanzados* 2008, 22, 33–52.
- (3) Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) & World Health Organization (WHO). 2009. Dengue. Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. New Edition. Geneva: World Health Organization. <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf> (visitado el 28 de febrero de 2016).
- (4) Schnackenberg, L. K.; Beger, R. D. Metabolomic Biomarkers: Their Role in the Critical Path. *Drug Discov. Today. Technol.* 2007, 4, 13–16.
- (5) Cui, L.; Lee, Y. H.; Kumar, Y.; Xu, F.; Lu, K.; Ooi, E. E.; Tannenbaum, S. R.; Ong, C. N. Serum Metabolome and Lipidome Changes in Adult Patients with Primary Dengue Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013, 7, e2373.
- (6) J.K. Nicholson, J.C. Lindon, E. Holmes, *Xenobiotica*. 1999. 29, 1181.
- (7) Beckonert, O.; Keun, H. C.; Ebbels, T. M. D.; Bundy, J.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. Metabolic Profiling, Metabolomic and Metabonomic Procedures for NMR Spectroscopy of Urine, Plasma, Serum and Tissue Extracts. *Nat. Protoc.* 2007, 2, 2692–2703.
- (8) Jov, M.; Angl, N.; Reguant, J.; Romero, M. P.; Jos, M.; Prat, J.; Pamplona, R.; Portero-otín, M. Multicompartmental LC-Q-TOF-Based Metabonomics as an Exploratory Tool to Identify Novel Pathways Affected by Polyphenol-Rich Diets in Mice. 2011, 3501–3512.
- (9) Gebregiworgis, T.; Powers, R. Application of NMR Metabolomics to Search for Human Disease Biomarkers. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2012, 15, 595–610.
- (10) Birungi, G.; Chen, S. M.; Loy, B. P.; Ng, M. L.; Fong, S.; Li, Y. Metabolomics Approach for Investigation of Effects of Dengue Virus Infection Using the EA.hy926 Cell Line. *J. Proteome Res.* 2010, 9, 6523–6534.
- (11) Bernardo, C. D. N. With NMR Towards New Diagnostic Methods For Dengue. *J. Anal. Bioanal. Tech.* 2012, 03.

- (12) Valero, N.; Espina, L. U. Z. M.; Añez, G.; Torres, E.; Mosquera, J. A. Short Report: Increased Level of Serum Nitric Oxide in Patients with Dengue. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2002**, 66, 762–764.
- (13) Barton, R. H.; Waterman, D.; Bonner, F. W.; Holmes, E.; Clarke, R.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. The Influence of EDTA and Citrate Anticoagulant Addition to Human Plasma on Information Recovery from NMR-Based Metabolic Profiling Studies. *Mol. Biosyst.* **2010**, 6, 215–224.
- (14) Misra, D.; Bajpai, U. Metabolite characterization in serum samples from normal healthy human subjects by ^1H and ^{13}C nmr spectroscopy. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **2009**, 23, 211–221.
- (15) Workshop Conference. Pathways. Metabolomics Gives Rise to Clinical Biomarkers for Metabolic Disease Treatment Monitoring. **2014**.
- (16) Heaton, N. S.; Randall, G. Dengue Virus Induced Autophagy Regulates Lipid Metabolism. *Cell Host Microbe* **2010**, 8, 422–432.