

AYUDAS A LA INVESTIGACIÓN IGNACIO H. DE LARRAMENDI

CONVOCATORIA AÑO 2020
(Salud)

MEMORIA FINAL

Investigador Principal: José Miguel Arbones Mainar
Entidad: Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón
País: España

La obesidad puede promover la aparición de cepas virulentas de SARS-CoV-2. Implicaciones para tratamientos y estrategias de vacunación.

Alexander Tristancho Baró, Servicio de Microbiología – Hospital Universitario Miguel Servet Zaragoza

Ana Martínez-Sapiña Pérez, Servicio de Microbiología – Hospital Universitario Miguel Servet Zaragoza

Ana M^a Milagro Beamonte, Servicio de Microbiología – Hospital Universitario Miguel Servet Zaragoza

Marta López Yus, Unidad de Investigación Traslacional- Hospital Universitario Miguel Servet Zaragoza.
Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

Míriam Latorre Millan, Servicio de Microbiología – Hospital Universitario Miguel Servet Zaragoza

Antonio Rezusta López, Servicio de Microbiología – Hospital Universitario Miguel Servet Zaragoza

Jos Miguel Arbonés Mainar, Unidad de Investigación Traslacional- Hospital Universitario Miguel Servet Zaragoza.
Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

Alexander Tristancho Baró. Ldo. en Medicina y Cirugía. Medico Interno Residente en el Servicio de Microbiología – Hospital Universitario Miguel Servet Zaragoza

Ana Martínez-Sapiña Pérez. Lda. en Medicina y Cirugía. Responsable de la Unidad de Virología del Servicio de Microbiología – Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza

Ana M^a Milagro Beamonte. Dra. en Medicina y Cirugía y especialista en Microbiología y Parasitología. Servicio de Microbiología – Hospital Universitario Miguel Servet ,Zaragoza

Marta López Yus. Lda. en Biotecnología y Máster Universitario en Clínica y Biología del Cáncer. Contratada predoctoral por el Gobierno de Aragón en el Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS). Unidad de Investigación Traslacional- Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza.

Míriam Latorre Millán. Diplomada en Nutrición Humana y Dietética, Lda. en Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Dra. en Medicina por la Universidad de Zaragoza. Investigadora de proyectos contratada por el Instituto de Investigación Sanitaria Aragón en el Servicio de Microbiología y Parasitología (Secciones Biología Molecular y Virología) – Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza

Antonio Rezusta López, Ldo. en Medicina y Cirugía, Dr. en Ciencias de la Salud y Biomedicina. Jefe del Servicio de Microbiología – Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza

José Miguel Arbonés Mainar, Ldo. en Farmacia, Ldo. en Bioquímica, Dr. en Medicina y Cirugía, Investigador principal del grupo de Biología del tejido adiposo y complicaciones metabólicas de la Obesidad en el Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS). Unidad de Investigación Traslacional- Hospital Universitario Miguel Servet Zaragoza.

INDICE

1. Resumen (Objeto y alcance)	4
2. Abstract en inglés	4
3. Introducción y Antecedentes	4
4. Hipótesis y objetivos	6
5. Materiales y Metodología	6
6. Resultados	7
7. Conclusiones	9
8. Bibliografía	9

1. RESUMEN

El objetivo de este proyecto es investigar la asociación entre las características genéticas del SARS-CoV-2 y el curso clínico de las personas obesas afectadas de COVID-19. Comprender las características patológicas subyacentes de las personas obesas con COVID-19, así como los diferentes resultados de salud que involucran las características genéticas de las variantes del virus, es esencial para brindar orientación para el control de la enfermedad y permitir la producción de vacunas más eficaces. Para lograrlo, el plan de trabajo propuesto consta de 2 objetivos principales organizados en orden consecutivo; 1) Secuenciación de los virus almacenados en el biobanco del Servicio de Microbiología del Hospital Miguel Servet para encontrar mutaciones virales asociadas a individuos obesos 2) realización de un análisis funcional de variantes virales y respuestas clínicas de los pacientes.

En este proyecto hemos encontrado 6 mutaciones en el genoma del SARS-CoV-2 asociadas específicamente a pacientes con un índice de masa corporal (IMC) elevado. Estas mutaciones podrían ayudar a comprender la especial virulencia de la COVID-19 en personas con sobrepeso u obesidad y deberían considerarse para vacunas dirigidas a esta población.

2. ABSTRACT

The ultimate goal of this project is to characterize the association between the genetic characteristics of SARS-CoV-2 and the clinical course of obese people affected by COVID-19. Understanding the underlying pathological features of obese people with COVID-19, as well as the different health outcomes that involve the genetic characteristics of virus strains, is essential to provide guidance for disease control and enable the production of more effective vaccines. To achieve this, the proposed work plan consisted of 2 main objectives organized in consecutive order; 1) Sequencing of the viruses stored in the biobank of the Microbiology Service of the Miguel Servet Hospital to find viral mutations associated with obese individuals 2) functional analysis of viral variants and clinical responses of patients.

In this project we have found 6 mutations in the SARS-CoV-2 genome specifically associated with patients with a high body mass index (BMI). These mutations could help understand the special virulence of COVID-19 in people who are overweight or obese and should be considered for vaccines aimed at this population.

3. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El nuevo coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2(SARS-CoV-2) ha trastornado el mundo con más de 45 millones de casos de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) y más de 1,2 millones de muertes en todo el mundo a finales de octubre de 2020 (1). Si bien los ancianos son los más gravemente afectados también se ha observado una mayor gravedad y tasas de mortalidad más altas entre las personas obesas que entre las no obesas. La obesidad es un inductor bien conocido de disfunción metabólica y se asocia con diabetes tipo 2, dislipidemia, hipertensión y enfermedad cardiovascular(2). Ahora está quedando claro que el aumento de la gravedad de la COVID-19 puede considerarse como otra morbilidad asociada a la obesidad. Sin embargo, poco se sabe del impacto que tiene un hospedador obeso sobre el propio virus y las posteriores consecuencias sobre la salud durante y después de la infección.

La mayoría de las personas con COVID-19 parecen desarrollar una enfermedad de leve a moderada caracterizada por fiebre, tos seca y dificultad para respirar, y se recuperan sin hospitalización. Sin embargo, en algunas personas puede progresar a condiciones más graves como neumonía e insuficiencia respiratoria. Se descubrió que los pacientes mayores y de sexo masculino, y aquellos que tienen afecciones médicas crónicas preexistentes, son vulnerables a la COVID-19 grave (3). Entre esas condiciones, la obesidad se ha asociado con un mayor riesgo de dar positivo por SARS-CoV-2 (4), así como un mayor riesgo de enfermedad grave y mortalidad [revisado en (5,6)]. La obesidad afecta a más de 650 millones de adultos (alrededor del 13% de la población adulta mundial) y a 124 millones de niños y adolescentes en

todo el mundo (7). El mecanismo subyacente por el cual la obesidad aumenta el riesgo de COVID-19 grave sigue siendo desconocido. Las principales líneas de investigación se han centrado en las complicaciones asociadas a la obesidad como las culpables de la COVID-19 grave. Así, la disnea se asocia con el riesgo de mortalidad entre los pacientes con COVID-19 (8) y las personas con obesidad tienden a sufrir disfunción respiratoria en varios niveles (9). Asimismo, la obesidad también aumenta el riesgo de algunas comorbilidades como la diabetes mellitus, los trastornos cardiovasculares, el cáncer y la enfermedad del hígado graso no alcohólico(2). Se considera que estas condiciones aumentan de forma independiente la probabilidad de enfermedad grave por COVID-19, independientemente del estado de obesidad (3).

Los sistemas metabólico e inmunológico son altamente interdependientes para la supervivencia de las especies. En consecuencia, la obesidad se manifiesta como una sobrecarga metabólica, manifestada por un exceso de tejido adiposo (TA), además de un trastorno inmunológico (10). La inflamación sistémica de bajo grado y el aumento de la resistencia a la insulina están fuertemente asociados con la presencia de acumulación excesiva de grasa, principalmente en los depósitos viscerales (11). Los pacientes obesos tienen una mayor concentración de citoquinas proinflamatorias circulantes como TNF- α , MCP-1 e IL-6 que promueven una respuesta proinflamatoria desregulada y eventos trombóticos (12). Además, las alteraciones en el perfil metabólico de las células T en la obesidad también pueden afectar la respuesta inmunitaria adaptativa (13). La obesidad también provoca una respuesta de interferón (IFN) atenuada y prolongada que muestra ineficacia antiviral (14). Todos estos factores pueden influir en el metabolismo de las células inmunitarias, lo que determina cómo responden los cuerpos a los patógenos, como el coronavirus SARS-CoV-2. Un concepto clave para este proyecto se ha demostrado en ratones obesos en los que un microambiente obesogénico podría impulsar la evolución genética del virus de la influenza H1N1 para producir mutaciones asociadas con un fenotipo más virulento (15). Este aumento de la virulencia provino de un deterioro de la respuesta del interferón que permitió la generación de poblaciones de virus de influenza más virulentas y una adaptación viral más rápida del huésped (15). Por lo tanto, es plausible suponer que un TA disfuncional, como ocurre a menudo en individuos obesos, puede desencadenar un envejecimiento prematuro del sistema inmunitario que refleja un estado inmunocomprometido. Tanto los huéspedes ancianos como los inmunocomprometidos pueden promover la aparición de nuevas variantes del SARS-CoV-2 (15–18).

La vigilancia epidemiológica de los virus en circulación mejorada por análisis de la información genética viral ha resultado útil para rastrear el origen y la propagación de varios virus (ébola, dengue, VIH) (19–21). Rambaut et al. desarrollaron un sistema de nomenclatura para la diversidad genética del SARS-CoV-2. y se han descrito 81 linajes virales hasta julio de 2020 (22). Aunque la tasa de evolución del SARS-CoV-2 es más baja que la observada en otros virus de ARN, probablemente debido a la función correctora de la ARN polimerasa, las cepas virales acumulan mutaciones y evolucionan continuamente. Al 22 de octubre de 2020, había más de 150 000 secuencias completas del genoma del SARS-CoV-2 disponibles públicamente, de las cuales se han identificado 19 525 variaciones del genoma (obtenido de <https://bigd.big.ac.cn/ncov/> y <https://www.gisaid.org/>). Estos linajes de SARS-CoV-2 han exhibido una variación considerable de transmisión y su tasa de mortalidad osciló entre 0,8 % y 14,5 % (23). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos por los cuales la transmisibilidad y patogenicidad del SARS-CoV-2 está evolucionando activamente. En este contexto, la presencia de un TA disfuncional puede surgir como un factor clave para la variabilidad del SARS-CoV-2 y explicaría, al menos en parte, la mayor susceptibilidad y el mal pronóstico de las personas obesas a la infección por COVID-19. Por lo tanto, los resultados de nuestro estudio alentarían mayores esfuerzos hacia la promoción de la salud y la prevención de infecciones en pacientes con ciertos tipos de obesidad más propensos a desarrollar complicaciones metabólicas. Es importante destacar que también se ha demostrado que la obesidad afecta el desarrollo de la memoria inmunológica. La vacunación contra la influenza da como resultado niveles equivalentes de anticuerpos específicos contra la influenza a los 30 días posteriores a la vacunación en adultos con y sin obesidad, pero los anticuerpos desaparecen más rápidamente en adultos con obesidad (24). Los datos de pacientes recuperados de COVID-19 muestran que ~95 % de los pacientes infectados desarrollan anticuerpos neutralizantes contra el SARS-CoV-2. Sin embargo, la evidencia preliminar sugiere una disminución de la producción de anticuerpos durante un período de semanas a meses (25), lo que sugiere que las estrategias de vacunas diseñadas para la

seroprotección de anticuerpos pueden no tener efectos tan duraderos. Varios estudios han encontrado que la generación de poblaciones de células T de memoria es fundamental para cualquier futura vacuna contra el COVID-19 (26). Desafortunadamente, como se ha demostrado que las respuestas de las células T están alteradas en las personas obesas, esto sugiere que una futura vacuna contra la COVID-19 puede ser menos eficaz en una población con una alta prevalencia de personas con obesidad. Todo lo anterior refuerza la idea de que se necesitan más esfuerzos para comprender si es necesario incluir algunas cepas virales específicas de obesos en futuras vacunas o si las personas obesas podrían necesitar dosis adicionales de vacuna para compensar su respuesta inmunológica alterada.

Comprender el mecanismo desencadenante subyacente a las características epidemiológicas y patológicas de las personas obesas con COVID-19, así como los diferentes resultados de salud que involucran las características genéticas de las cepas del virus, es esencial para predecir la tendencia epidémica y brindar orientación para el control y los tratamientos de la enfermedad. Sin embargo, igualmente importante puede ser comprender el impacto que tendrá la población obesa en el aumento potencial de la virulencia del SARS-CoV-2. En respuesta a la pandemia de COVID-19, se ha registrado una cantidad abrumadora de ensayos clínicos para probar una variedad de estrategias preventivas y terapéuticas (27). El desarrollo de vacunas contra la COVID-19 puede beneficiarse de los estudios que señalan mutaciones específicas con mayor virulencia o más prevalentes en grupos clave como las personas obesas, lo que permite producir vacunas más estables y eficaces. Es urgente que todos los ensayos de vacunas incluyan el IMC y las cepas virales asociadas al IMC en su investigación sobre la eficacia y la protección de las vacunas.

4. HIPOTESIS Y OBJETIVO

Nuestra hipótesis es que 1) la variabilidad en el genotipo viral puede estar asociada con diferentes presentaciones clínicas y, por lo tanto, contribuir a estas diferencias observadas relacionadas con el peso corporal en la gravedad de la enfermedad y 2) las características metabólicas de los pacientes obesos (vinculadas a sus enfermedades crónicas asociadas) pueden estar asociado con un pronóstico diferente dependiendo de algunas variaciones genéticas del virus.

El objetivo principal de este proyecto es caracterizar la asociación entre las características genéticas del SARS-CoV-2 y el curso clínico en las personas obesas. Comprender estos factores no solo ayudará a discernir mejor la patogénesis de COVID-19, sino que también guiará el diseño de programas de promoción de la salud más efectivos, así como terapias y estrategias de vacunas para la medicina personalizada.

5. METODOLOGIA

Los 2 objetivos principales están organizados en orden consecutivo y cada uno de los cuales consta de varias tareas.

Objetivo 1: Secuenciación y análisis bioinformático (Enero-Abril de 2021)

- 1.1. Distribución de genotipos virales en función del IMC. (Enero - Febrero de 2021)

Usaremos la información de la secuencia del virus ya disponible con los objetivos específicos de encontrar mutaciones virales asociadas a individuos obesos. Las secuencias virales sin procesar obtenidas por secuenciación de próxima generación serán limpiadas, depuradas e introducidas en una base de datos específica.

Las secuencias del genoma viral se alinearán sobre la referencia NC_045512.2 y las alineaciones se convertirán en una lista anotada de todos los eventos mutacionales.

- 1.2 Identificación de determinantes genómicos de virulencia.

Objetivo 2: Análisis funcional de variantes virales y respuestas de los pacientes. (Mayo-Diciembre de 2021)

- 2.1 Análisis de trayectorias longitudinales de parámetros seleccionados relacionados con la inflamación y el estado funcional de los pacientes.
- Los cambios de las pruebas de laboratorio se analizarán para las asociaciones longitudinales entre las analíticas bioquímicas de los pacientes disponibles durante la hospitalización y los determinantes genómicos de virulencia obtenidos en 1.2.
- 2.2 Respuesta inmune.
 - 2.2.1 Pruebas serológicas de antígenos específicos del SARS-CoV-2. (Mayo-septiembre de 2021)

Evaluación de los niveles de IgG específicas contra los antígenos virales específicos (NP, RBD, S1, S1S2; y combinaciones entre ellos) en un ensayo basado en “beads” utilizando las muestras almacenadas en el biobanco. Comparación de los niveles de antígeno como indicadores de la virulencia viral entre los determinantes genómicos de la virulencia obtenidos en 1.2 y entre nuestros grupos de muestra estudiados (obesos versus no obesos / MHO versus MHRO) descritos en 1.1.
 - 2.2.2. Perfil inmunológico de pacientes con COVID-19. (Octubre de 2021)

Ensayos de Luminex para analizar citoquinas en individuos obesos con COVID-19 entre los determinantes genómicos de la virulencia obtenidos en 1.2.

El análisis final integrado de las características inmunes y clínicas asociadas con los determinantes genómicos de virulencia obtenido en 1.2., Las pruebas funcionales (2.2.1 y 2.2.2) y la evaluación longitudinal de los pacientes (2.1) se realizarán durante el mes de Noviembre y Diciembre de 2021.

6.RESULTADOS

6.1 Características de los pacientes incluidos en el estudio

Se seleccionaron 1159 pacientes y se incluyeron en el estudio 675 pacientes (58,5 % mujeres, mediana de edad = 61 años) (Fig. 1A). De estos, 260 (38,5%) requirieron ingreso hospitalario, 24 (3,6%) requirieron UCI y 95 (14,1%) fallecieron. La mediana del índice de masa corporal (IMC) fue de 26,9 kg/m². La distribución del IMC de todos los pacientes se ilustra en la Figura 1B.

Figura 1

6.2 Características virales y mutaciones asociadas con índice de masa corporal elevado

Se utilizó Nextclade (<https://clades.nextstrain.org/>) para analizar las diferencias entre la secuencia original del virus SARS-CoV-2 y las secuencias de los virus que infectaron a los pacientes. En general, el análisis global de las secuencias mostró 205 mutaciones con respecto al genoma de referencia del SARS-CoV-2. 119 (58,3%) y 77 (37,7%) correspondían a mutaciones missense y sinónimas respectivamente, mientras que 3 (1,47%) eran mutaciones stop-gain (5 no pudieron mapearse). Al observar todas las mutaciones, identificamos una mediana de 8 mutaciones que involucran sustituciones de aminoácidos en cada muestra. Al mapear en Nextstrain identificamos 7 variantes del virus (fig 1C), casi la mitad de las secuencias correspondían a la 20 E (EU1), la más abundante en España desde Julio/2020 hasta Enero/2021.

Posteriormente las mutaciones observadas se analizaron más a fondo en busca de asociaciones con el IMC. Encontramos 6 mutaciones específicas cuyos portadores tenían un IMC significativamente mayor en comparación con la mediana del IMC de la cohorte del estudio (Tabla 1). De estas 6 mutaciones específicas, C313T, C14599T y A20268G eran sinónimas, mientras que C25904T y T22882G eran mutaciones sin sentido. G28083T correspondió a una mutación stop-gain. Clasificados según su frecuencia alélica menor

(MAF), 5 de 6 eran variantes de baja frecuencia ($0,01 \leq \text{MAF} < 0,05$) mientras que 1 era una mutación común ($\text{MAF} > 0,05$). Todas las mutaciones se encontraron en la región codificante del virus y las regiones genómicas donde se ubicaron las mutaciones se indican en la Tabla 1.

Tabla 2. Mutaciones asociadas a individuos con obesidad

mutation	frecuency	Carriers BMI (kg/m ²)	viral region	type
C25904T	0.02	32.00	orf3A	missense
C313T	0.02	29.30	nsp1	synonymous
T22882G	0.02	29.26	spike	missense
G28083T	0.03	29.22	orf8	stopGain
C14599T	0.03	29.05	orf1ab	synonymous
A20268G	0.13	28.04	orf1ab	synonymous

A continuación, utilizamos un análisis de regresión logística para calcular la razón de posibilidades (OR) y los intervalos de confianza (IC) para la hospitalización y la muerte de los portadores de las mutaciones asociadas al IMC (Figura 2). La presencia de la mutación A20268G en el virus infeccioso aumentó en ~50 % el riesgo de hospitalización (OR: 1,59, IC: 1,02-2,49), mientras que los pacientes infectados con un virus que albergaba la mutación C313T tenían un aumento del 428 % en el riesgo de muerte (OR: 4,28, IC: 1,40-12,15). Curiosamente, el C14599T actuó como factor protector para la hospitalización. Es de destacar que algunos OR para exitus no se pudieron calcular porque sus intervalos de confianza eran infinitos.

FIGURA 2. Resultados clínicos según las mutaciones presentes en SARS-CoV-2

6.3 Perfil inmunológico de pacientes con COVID

A continuación, realizamos un inmunoensayo para la detección cualitativa de anticuerpos neutralizantes (nAb) del SARS-CoV-2 orientado a la detección de la proteína de la nucleocápside (N) en el plasma de los pacientes. No se observó correlación entre el IMC y los niveles de nAb. Sin embargo, los pacientes infectados con SARS-CoV-2 que albergaban la mutación A20268G presentaron niveles elevados de nAb ($p < 0,001$). No se observaron diferencias significativas en el nAb con las otras mutaciones investigadas (Fig. 3).

Los resultados se informan como valores numéricos en forma de un índice de corte (COI; muestra de señal/corte)

FIGURA 3. Anticuerpos neutralizantes en plasma según las mutaciones presentes en SARS-CoV-2

Finalmente, investigamos si la presencia de mutaciones asociadas al IMC alteraba o no el perfil inmunoinflamatorio de aquellos pacientes con COVID-19 grave. Para ello, se midieron en pacientes

hospitalizados diferentes marcadores inflamatorios, proteína de fase aguda, así como otros parámetros relacionados con respuesta alterada o peor evolución clínica (fig. 4).

Los casos graves se asocian típicamente con respuestas inflamatorias aberrantes y excesivas que reflejan una activación aguda de la inmunidad innata. En consecuencia, encontramos una respuesta inmune hiperactivada con valores elevados de los parámetros bioquímicos investigados para todos los pacientes. Sin embargo, no observamos diferencias específicas de mutación en los valores de ningún marcador proinflamatorio (IL-6, dímero D, LDH, fosfatasa alcalina o troponina I), ni cambios en otros niveles de APP (PCR, glucosa, ferritina o GGT).

Figura 4. Marcadores inflamatorios y citoquinas según la presencia o ausencia de las mutaciones encontradas

7. CONCLUSIONES

Si bien los ancianos son los más afectados por la COVID-19 grave, también se ha observado una mayor gravedad y mayores tasas de mortalidad entre las personas con obesidad. En este proyecto hemos encontrado 6 mutaciones en el genoma del SARS-CoV-2 asociadas específicamente a pacientes con IMC alto. Estas mutaciones podrían ayudar a comprender esta mayor virulencia del COVID-19 en personas con sobrepeso u obesidad y deberían considerarse para vacunas dirigidas a esta población.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Dong E, Du H, Gardner L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect. Dis.* 2020;20(5):533–534.
2. Afshin A et al. . Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(1):13–27.
3. Berlin DA, Gulick RM, Martinez FJ. Severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2020. doi:10.1056/NEJMcp2009575.
4. de Lusignan S et al.. Risk factors for SARS-CoV-2 among patients in the Oxford Royal College of General Practitioners Research and Surveillance Centre primary care network: a cross-sectional study. *Lancet Infect. Dis.* 2020;20(9):1034–1042.
5. Huang Y, Obesity in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism.* 2020;113:154378.
6. Chang T-H et al. Effect of obesity and body mass index on coronavirus disease 2019 severity: A systematic review and meta-analysis. *Obes. Rev.* 2020;n/a(n/a). doi:10.1111/obr.13089.
7. World Health Organization. Obesity and overweight. 2020. 2020.
8. Shi L et al. Dyspnea rather than fever is a risk factor for predicting mortality in patients with COVID-19. *J. Infect.* 2020;81(4):647–679.
9. Sin DD, Jones RL, Man SFP. Obesity is a risk factor for dyspnea but not for airflow obstruction. *Arch. Intern. Med.* 2002;162(13):1477–1481.
10. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature* 2017;542(7640):177–185.
11. West-Eberhard MJ. Nutrition, the visceral immune system, and the evolutionary origins of pathogenic obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2019;116(3):723 LP – 731.
12. Korakas E, et al. Obesity and COVID-19: immune and metabolic derangement as a possible link to adverse clinical outcomes. *Am. J. Physiol. Metab.* 2020;319(1):E105–E109.
13. Green WD, Beck MA. Obesity impairs the adaptive immune response to influenza virus. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 2017;14(Supplement 5):S406–S409.

14. Tian Y, Jennings J, Gong Y, Sang Y. Viral Infections and Interferons in the Development of Obesity. *Biomolecules* 2019;9(11):726.
15. Honce R et al.. Obesity-Related Microenvironment Promotes Emergence of Virulent Influenza Virus Strains. *Moscona A, ed. MBio* 2020;11(2):e03341-19.
16. Gay RT, Belisle S, Beck MA, Meydani SN. An aged host promotes the evolution of avirulent coxsackievirus into a virulent strain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006;103(37):13825–13830.
17. Peña J et al.. Sendai virus intra-host population dynamics and host immunocompetence influence viral virulence during in vivo passage. *Virus Evol.* 2016;2(1):vew008.
18. Steyer A, et al. Intrahost Norovirus Evolution in Chronic Infection Over 5 Years of Shedding in a Kidney Transplant Recipient. *Front. Microbiol.* 2018;9:371.
19. Lemey P et al. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003;100(11):6588–6592.
20. Holmes EC et al. The evolution of Ebola virus: Insights from the 2013–2016 epidemic. *Nature* 2016;538(7624):193–200.
21. Yang C-F, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of dengue viruses imported into Taiwan during 2011-2016. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018;12(9):e0006773.
22. Rambaut A et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat. Microbiol.* 2020;5(11):1403–1407.
23. Korber B et al.. Tracking changes in SARS-CoV-2 Spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell* 2020;182(4):812–827.
24. Sheridan PA, Paich HA, Handy J, Karlsson EA, Hudgens MG, Sammon AB, Holland LA, Weir S, Noah TL, Beck MA. Obesity is associated with impaired immune response to influenza vaccination in humans. *Int. J. Obes.* 2012;36(8):1072–1077.
25. Seow J, et al. Longitudinal evaluation and decline of antibody responses in SARS-CoV-2 infection. *medRxiv* 2020:2020.07.09.20148429.
26. Altmann DM, Boyton RJ. SARS-CoV-2 T cell immunity: Specificity, function, durability, and role in protection. *Sci. Immunol.* 2020;5(49).
27. Jeyanathan M, et al. Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies. *Nat. Rev. Immunol.* 2020;20(10):615–632.