

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Pediatria

Ana Carolina Alves Lamounier

Distribuição das proteínas ECA2 e TMPRSS2 em amostras de pulmão de pacientes
em faixa etária pediátrica

São Paulo
2023

Ana Carolina Alves Lamounier

**Distribuição das proteínas ECA2 e TMPRSS2 em amostras de pulmão de
pacientes em faixa etária pediátrica**

Versão original

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Pediatria

Orientador: Prof. Dr. Luiz Vicente Ribeiro
Ferreira da Silva Filho

São Paulo
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lamounier, Ana Carolina Alves

Distribuição das proteínas ECA2 e TMPRSS2 em amostras de pulmão de pacientes em faixa etária pediátrica / Ana Carolina Alves Lamounier. -- São Paulo, 2023.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Pediatria.

Orientador: Luiz Vicente Ribeiro Ferreira da Silva Filho.

Descritores: 1.COVID-19 2.SARS-CoV-2 3.ECA2
4.TMPRSS2 5.Sistema respiratório 6.Histologia
7.Pediatria 8.Patologia 9.Envelhecimento

USP/FM/DBD-429/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Lamounier ACA. Distribuição das proteínas ECA2 e Tmprss2 em amostras de pulmão de pacientes em faixa etária pediátrica [mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2023.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof^a. Dr^a. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof^(a). Dr^(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A todas as crianças e mulheres, com a esperança de alcançarmos a equidade, inclusive na ciência.

AGRADECIMENTOS

Ao Amor, a razão de tudo.

À minha irmã e melhor amiga, Gabriela, pela paciência, acolhimento e coragem essenciais.

Aos meus pais, Sandra e Itagiba, pelo melhor amor que nos dedicam.

Aos meus sobrinhos, Giovanna, afilhado Nicolas, Miguel, Gabriel e Clara, por serem minha alegria de viver, e às minhas irmãs Bianca e Fernanda pelo carinho.

Às minhas amigas Alice, Anna Karla e Elisa pelo apoio e amizade que inspiram.

Aos professores Thais Mauad, Luiz Vicente Ribeiro F. S. Filho e à Dr^a. Natalia S. X. Costa pela paciência e conhecimentos transmitidos.

RESUMO

Lamounier ACA. Distribuição das proteínas ECA2 e TMPRSS2 em amostras de pulmão de pacientes em faixa etária pediátrica [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2023.

O SARS-CoV-2, vírus responsável pela COVID-19, necessita da protease transmembrana de serina 2 (TMPRSS2) e da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) para entrar na célula hospedeira. Desde o início da pandemia, crianças apresentam, frequentemente, quadros menos graves e manifestações respiratórias mais leves quando infectadas pelo SARS-CoV-2. O presente estudo avaliou a expressão dessas proteínas em sistema respiratório inferior, a fim de elucidar, em parte, o motivo da apresentação respiratória menos grave nesse grupo etário. Foram avaliadas 94 amostras de tecido pulmonar do acervo do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, oriundas de pacientes com idades entre recém-nascidos até 95 anos de idade. A distribuição da expressão de ECA2 e TMPRSS2 em alvéolos e em alguns brônquios e bronquíolos foram avaliadas, por meio de imuno-histoquímica e de mapeamento quantitativo das imagens das lâminas digitalizadas. As expressões de ECA2 e TMPRSS2 no parênquima pulmonar das crianças foram maiores do que no dos adultos ($p=0,015$ e $p=0,006$, respectivamente), sendo a TMPRSS2 mais expressa no parênquima pulmonar das crianças ($p=0,008$) do que no dos idosos. Nas vias aéreas, a TMPRSS2 esteve mais presente nas vias aéreas cartilaginosas das crianças do que nas dos idosos ($p=0,044$). Análises de correlação revelaram que a expressão dessas duas proteínas no parênquima pulmonar diminui com o envelhecimento. Essa expressão maior no pulmão das crianças evidencia, portanto, a necessidade de mais pesquisas com foco na diferença de idade para entender o que é, realmente, responsável pela menor frequência de doença respiratória grave por SARS-CoV-2 nas crianças.

Palavras-chave: COVID-19. SARS-CoV-2. ECA2. TMPRSS2. Sistema respiratório. Histologia. Patologia. Pediatria. Envelhecimento.

ABSTRACT

Lamounier ACA. Distribution of ACE2 and TMPRSS2 proteins in lung samples from pediatric patients [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2023.

The SARS-CoV-2 virus, responsible for COVID-19, requires the transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2) and the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) to enter the host cell. Since the beginning of the pandemic, children have often presented with milder symptoms and less severe respiratory manifestations when infected with SARS-CoV-2. This present study assessed the expression of these proteins in the lower respiratory system in order to partially elucidate the reason for the less severe respiratory presentation in this age group.

Ninety-four samples of lung tissue from the Department of Pathology at the Faculty of Medicine of the University of São Paulo were evaluated, originated from patients ranging in age from newborn to 95 years old. The distribution of ACE2 and TMPRSS2 expression in alveoli and some bronchi and bronchioles was assessed through immunohistochemistry and quantitative mapping of digitized slide images. The expressions of ACE2 and TMPRSS2 in the lung parenchyma of children were higher than those in adults ($p=0.015$ and $p=0.006$, respectively), with TMPRSS2 being more expressed in the lung parenchyma of children ($p=0.008$) than in the elderly. In the airways, TMPRSS2 was more prevalent in the cartilaginous airways of children than in the elderly ($p=0.044$). Correlation analyses revealed that the expression of these two proteins in lung parenchyma decreases with aging. This higher expression in children's lungs highlights the need for further research focusing on age differences to understand what is truly responsible for the lower frequency of severe respiratory disease from SARS-CoV-2 in children.

Keywords: COVID-19. SARS-CoV-2. ACE2. TMPRSS2. Respiratory system. Histology. Pathology. Pediatrics. Ageing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Expressão de ECA2 e TMPRSS2 no parênquima pulmonar de crianças sem e com sepse	21
Figura 2 – Expressão de ECA2 e TMPRSS2 no parênquima pulmonar de crianças sem sepse, adultos e idosos	22
Figura 3 – Expressão de ECA2 e TMPRSS2 no parênquima pulmonar nas faixas etárias de crianças sem sepse	24
Figura 4 – Expressão de ECA2 e TMPRSS2 em diferentes idades	25 e 26
Figura 5 – ECA2 e TMPRSS2 no parênquima pulmonar feminino e masculino, independentemente da idade	28
Figura 6 – Expressão dos marcadores ECA2 e TMPRSS2 no parênquima pulmonar de adultos (20 a 59 anos de idade) e idosos (60 a 95 anos de idade) com e sem COVID-19	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – População de estudo	20
Tabela 2 – Crianças sem sepse	21
Tabela 3 – Correlação entre o parênquima pulmonar e a via aérea nas crianças e adultos/idosos	23
Tabela 4 – Análise descritiva da ECA2 e Tmprss2 no parênquima pulmonar de crianças sem sepse, adultos e idosos	26
Tabela 5 – Análise descritiva da ECA2 e Tmprss2 em vias aéreas de crianças sem sepse, adultos e idosos	27
Tabela 6 – Correlação entre estruturas (parênquima pulmonar e vias aéreas), proteínas (ECA2 e Tmprss2) e idade (0 a 95 anos)	29

LISTA DE ABREVIATURAS

COVID-19	Coronavirus Disease 2019
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina-2
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
mRNA	RNA mensageiro
NO	Óxido Nítrico
TMPRSS2	Protease Transmembrana de Serina-2
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2
SIRT1/eNOS	Sirtuin 1/ endothelial Nitric Oxide Synthase
VSR	Vírus Sincicial Respiratório

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
	1.1 Justificativa	14
	1.2 Hipótese.....	14
2	OBJETIVOS	15
	2.1 Objetivo geral	15
	2.2 Objetivos específicos	15
3	MÉTODOS	16
	3.1 Método de preparo das lâminas e da realização da imuno- histoquímica	17
	3.2 Método de interpretação dos resultados da imuno-histoquímica 	18
	3.3 Análise estatística	19
	3.4 Aspectos éticos	19
4	RESULTADOS	20
5	DISCUSSÃO	31
6	CONCLUSÕES	35
	REFERÊNCIAS	36
	APÊNDICE	40

1. INTRODUÇÃO

A pandemia de COVID-19 foi causada pelo SARS-CoV-2, um betacoronavírus que se assemelha em 79,6% ao SARS-CoV, responsável pela SARS em 2002 e 2003. No envelope do SARS-CoV-2, há uma glicoproteína, *Spike* (S), que se liga a um receptor específico, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), após essa glicoproteína ser ativada pela protease transmembrana de serina 2 (TMPRSS2), a fim de proporcionar a fusão com a membrana plasmática e a entrada na célula alvo (1-5).

Como uma homóloga da enzima conversora de angiotensina, a ECA2, uma metaloproteinase, atua no sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Este sistema coordena o tônus vascular e a homeostase hidroeletrólítica. A ECA cliva a angiotensina I em angiotensina II, cuja função principal é promover a vasoconstrição; enquanto ECA2 degrada a angiotensina I em angiotensina 1-9, e a angiotensina II em angiotensina 1-7; equilibrando as ações da angiotensina II (6). Estudos com infecção por SARS-CoV em camundongos (7) e por SARS-CoV-2 em hamsters (8) revelaram que esses vírus diminuem a expressão da ECA2, o que desregula o SRAA e induz lesões pulmonares graves.

O gene do receptor ECA2 localiza-se no cromossomo X e, quando foi descoberto em 2000, níveis altos de seu RNA mensageiro (mRNA) foram encontrados no coração, nos rins e nos testículos (9). No entanto, a proteína é expressa no coração, nos rins, no intestino, nos pulmões, nas células endoteliais arteriais e venosas e nas células musculares lisas arteriais (10), porém quase não detectada no parênquima pulmonar de adultos (11, 12), em que apresenta uma distribuição heterogênea (13, 14).

Nos pulmões, os receptores ECA2 apresentam-se nas células epiteliais alveolares principalmente as do tipo II (pneumócitos II). Nas vias aéreas, encontram-se no citoplasma das células epiteliais brônquicas (10) e um estudo sobre SARS-CoV revelou a preferência desse vírus por infectar células epiteliais bem diferenciadas (15). Em camundongos saudáveis, o nível plasmático e a atividade da ECA2 nas células pulmonares tendem a ser baixos (16).

Já a TMPRSS2, que pertence à família de proteases transmembrana de serina tipo I, tem sua expressão gênica estimulada por hormônios andrógenos, sendo encontrada em níveis elevados no câncer de próstata andrógeno-dependente (17). Além disso, também está envolvida na ativação da glicoproteína do SARS-CoV (18),

metapneumovírus humano (19) e vírus parainfluenza humano(20), contribuindo para o mecanismo de entrada desses vírus nas células.

A TMPRSS2 apresenta-se na membrana das células dos rins, da próstata, e do trato gastrointestinal, como no pâncreas; na fisiologia humana, porém, ainda não se conhece a ação dessa protease (21). Um estudo sobre COVID-19 revelou, por sequenciamento de mRNA, que ECA2 e TMPRSS2 são simultaneamente expressas em células caliciformes nasais, pneumócitos II e enterócitos ileais (22).

O aumento exponencial dos casos de COVID-19, principalmente antes da vacinação, revelou que grande parte dos infectados apresentavam sintomas leves da doença, e as crianças representavam parte significativa desse grupo (23-28). Ainda se desconhece por que a incidência de formas graves de infecção por SARS-CoV-2 em crianças foi tão baixa. Entre as hipóteses sugeridas, uma foi a maior frequência de infecções por outras espécies de alfacoronavírus que poderia conferir imunidade cruzada. Adicionalmente, aventou-se a hipótese de reações imunológicas distintas das dos adultos contra a infecção pelo SARS-CoV-2, com uma atuação mais eficiente do sistema imune inato na eliminação do vírus. Outra hipótese seria uma diferença na expressão do receptor ECA2 nas vias aéreas inferiores ou nos alvéolos de crianças, quando comparadas a outras faixas etárias (29, 30).

Um estudo avaliou a presença de mRNA de ECA2 em amostras de epitélio nasal de pacientes entre 4 e 60 anos, demonstrando um aumento progressivo desse marcador com a idade (31). Outros estudos, que analisaram dados transcriptômicos, demonstraram uma menor quantidade de mRNA de ECA2 e TMPRSS2 em células epiteliais nasais e brônquicas de crianças, comparada com a expressão desses genes em indivíduos adultos (32, 33).

A maioria dos estudos anteriores avaliou adultos, não sendo encontrados muitos dados sobre a expressão das proteínas ECA2 e TMPRSS2 em tecido pulmonar de indivíduos menores de 20 anos de idade. Duas pesquisas demonstraram que crianças expressam menos essas duas proteínas nos pulmões do que os adultos(34, 35), enquanto em outros estudos a ECA2 esteve mais presente no parênquima pulmonar de crianças (13, 36). Portanto, o presente estudo buscou avaliar a distribuição dessas proteínas, por imuno-histoquímica, em amostras de pulmões originadas de autópsias de indivíduos de diferentes faixas etárias, com o intuito de compreender se essa distribuição se relaciona às manifestações geralmente menos graves no trato respiratório inferior de crianças.

1.1 JUSTIFICATIVA

A maioria dos estudos sobre a COVID-19 foi realizada em adultos e considerando as proteínas ECA2 e a TMPRSS2, esses estudos utilizaram bancos de dados transcriptômicos, com poucos dados disponíveis na literatura acerca da expressão dessas duas proteínas na membrana de células de tecido pulmonar de crianças.

A análise da distribuição das proteínas ECA2 e TMPRSS2 nos pulmões de pessoas de diferentes faixas etárias, por conseguinte, poderia elucidar, em parte, o motivo do quadro clínico mais brando observado em crianças infectadas pelo SARS-CoV-2.

1.2 HIPÓTESE

A expressão proteica de ECA2 e TMPRSS2 é menor no tecido pulmonar (vias aéreas e parênquima) de crianças do que no de adultos e de idosos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Descrever a distribuição das proteínas ECA2 e TMPRSS2, por meio de imunohistoquímica, em pulmões de indivíduos de diferentes faixas etárias, desde recém-nascidos a 95 anos de idade.

2.2 Específicos:

- 2.2.1** Avaliar a distribuição das proteínas ECA2 e TMPRSS2 nos alvéolos, vias aéreas cartilaginosas e não cartilaginosas de crianças, de acordo com o diagnóstico de sepse como uma das causas de óbito;
- 2.2.2** Avaliar a distribuição das proteínas ECA2 e TMPRSS2 nos alvéolos e nas vias aéreas cartilaginosas e não cartilaginosas de acordo com a faixa etária dividida em crianças sem sepse (< 20anos), adultos (20-59 anos) e idosos (≥ 60 anos);
- 2.2.3** Avaliar a distribuição das proteínas ECA2 e TMPRSS2 nos alvéolos e nas vias aéreas cartilaginosas e não cartilaginosas de acordo com a faixa etária dividida em 0-1 ano, $\geq 2-5$ anos, $\geq 6-10$ anos, $\geq 11-15$ anos, $\geq 16-19$ anos (crianças sem sepse), 20-59 anos e ≥ 60 anos;
- 2.2.4** Avaliar a distribuição das proteínas ECA2 e TMPRSS2 nos alvéolos, vias aéreas cartilaginosas e não cartilaginosas de indivíduos de acordo com o sexo;
- 2.2.5** Avaliar a distribuição das proteínas ECA2 e TMPRSS2 nos alvéolos de indivíduos adultos e idosos (20-59 anos e ≥ 60 anos, respectivamente) de acordo com o diagnóstico de COVID-19 como uma das causas de óbito.

3. MÉTODOS

A partir do acervo do Arquivo Histórico do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, foram selecionados cerca de 500 laudos de autópsias, cujos óbitos ocorreram entre 1998 e 2020. Desses, 104 dispunham de amostra de tecido pulmonar, e produzidas lâminas em que 48 casos foram avaliados, por imuno-histoquímica, a distribuição de ECA2 e Tmprss2 em alvéolos e alguns brônquios e bronquíolos. Foram comparados a de 46 casos de adultos e idosos (18 sem e 28 com COVID-19), amostras que fazem parte do Estudos da COVID-19 fatal por meio da autópsia minimamente invasiva guiada por ultrassom.

Critérios de inclusão:

- Idade entre 0 e 19 anos;
- Amostra em boas condições, localizável no acervo e com dados clínicos disponíveis, com laudo de autópsia descrevendo poucas lesões pulmonares, ausência de processo inflamatório significativo, neoplasias, hemorragia de monta na análise histológica preliminar, e foram incluídos casos com congestão terminal ou pequenas alterações de caráter inespecífico;

Critérios de exclusão:

- Amostra cujo laudo de autópsia apresentava doenças pulmonares crônicas (bronquiolite obliterante, fibrose cística, doenças pulmonares intersticiais), com tecido pulmonar muito distinto do saudável (barotrauma, edema ou hemorragia importantes, malformações, infecções), à análise das lâminas ao microscópio óptico.

3.1 Método de preparo das lâminas e da realização da imuno-histoquímica

Os fragmentos de diferentes regiões de tecido pulmonar, coletados em autópsia de rotina e, nos pacientes com COVID-19, por meio de autópsia minimamente invasiva, estavam armazenados em solução de formalina a 10% tamponada para manutenção do pH por um período de até 48 horas e submetidos a embebição e emblocamento em parafina. Os blocos com os fragmentos são catalogados e armazenados no acervo do Arquivo Histórico do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

Esses blocos foram submetidos, no laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da FMUSP, a cortes histológicos de 4 micrômetros de espessura para coloração de Hematoxilina e Eosina (HE), a fim de análise geral e uso de técnica imuno-histoquímica, com o intuito de identificar as proteínas ECA2 e Tmprss2.

As lâminas selecionadas foram marcadas, no laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia da FMUSP, com os anticorpos monoclonais anti-ECA2 (CL4035) da *Thermo Fisher Scientific*, catalog#MA5-31395, Ref.: AB_2787031 (diluição 1:2500); e anti-Tmprss2 [EPR3862] da ABCAM Ref.: ab109131ul100 (diluição 1:3000).

Em se tratando das reações, seguiu-se a rotina das reações imuno-histoquímicas, que incluem a desparafinização com imersão em xilol sob calor por 20 minutos, seguida de três banhos de resfriamento e hidratação do tecido com banhos sequenciais em álcool com concentrações decrescentes. A recuperação antigênica foi feita por meio de pré-tratamento com citrato em alta temperatura por 45 minutos; e peróxido de hidrogênio, utilizado para inibir a peroxidase endógena. O bloqueio de reações inespecíficas ocorre por meio de banho em leite desnatado a 2% por 10 minutos, seguido da aplicação dos anticorpos primários e incubação por 20 horas a 4°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS por cinco minutos em três vezes, e o anticorpo secundário (*Novolink, Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido*) aplicado por uma hora em estufa a 37°C. A revelação da reação ocorreu por meio de aplicação do cromógeno diaminobenzidina por 5 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas com banhos sucessivos de álcool em concentrações crescentes e xilol, e contra coradas com hematoxilina de Harris.

3.2 Método de interpretação dos resultados da imuno-histoquímica

As lâminas imunomarcadas com anticorpos contra ECA2 e contra Tmprss2 foram digitalizadas utilizando o *Scanner Panoramic Flash (3D Histech, Budapeste, Hungria)*, do Departamento de Patologia da FMUSP, com objetiva de 20x.

Foram definidas 15 áreas de alvéolos pulmonares, em ampliação de 400x, para completar 5 milímetros de septo pulmonar, para cada anticorpo, em cada caso. Assim como, pelo menos 3 até 5 milímetros das pequenas e das grandes vias aéreas, utilizando-se a ferramenta de “*Regions of Interest / Area of Interest*” do software de visualização das lâminas digitalizadas – *Panoramic Viewer* versão 6.5 (*3D Histech, Budapeste, Hungria*). As áreas foram exportadas para formato TIFF mantendo a resolução original e posteriormente convertidas em formato JPG de qualidade máxima utilizando-se o software *Adobe Photoshop (Adobe, San Jose - CA, USA)*.

As imagens foram transferidas para o software *Image Pro Plus*, versão 4.5 (*Media Cybernetics, USA*). O software foi previamente calibrado para a conversão de pixels em micrômetros; e um intervalo de positividade, determinado a partir da análise de um conjunto de lâminas para cada anticorpo, gerando assim um padrão que foi salvo e aplicado a todas as imagens na quantificação.

Em cada imagem, o epitélio correspondente é desenhado por meio da ferramenta de região de interesse e as quantificações incluem os seguintes parâmetros:

- Via aérea proximal (cartilaginosas):
 - Área positiva do marcador (μm^2);
 - Densidade óptica integrada (sem unidade);
 - Área total medida (μm^2);
 - Perímetro da membrana basal epitelial correspondente (μm).
- Via aérea distal (não cartilaginosas):
 - Área positiva do marcador (μm^2);
 - Densidade óptica integrada (sem unidade);
 - Área total medida (μm^2);
 - Perímetro da membrana basal epitelial correspondente (μm).
- Alvéolos (parênquima pulmonar):
 - Área positiva do marcador (μm^2);
 - Densidade óptica integrada (sem unidade);

Área total medida (μm^2);
Comprimento do septo alveolar correspondente ao epitélio marcado (μm) (37).

3.3 Análise estatística

Há dificuldade em encontrar autópsias com tecido pulmonar mais próximo ao saudável, por isso a pesquisa incluiu o maior número possível de casos, considerando a amostra como de conveniência.

O pacote estatístico utilizado foi o SPSS versão 21; SPSS Inc.® (Chicago Illinois, EUA). A avaliação da normalidade dos dados foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e revelou que os dados eram não-paramétricos. Os testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis foram usados para comparar dois grupos, e três ou mais grupos, respectivamente. Os resultados são apresentados como mediana (intervalo interquartil - IQR). O nível estatístico de significância adotado foi de 5%.

3.4 Aspectos éticos

A pesquisa insere-se num grande estudo do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, denominado Estudos da COVID-19 fatal por meio da autópsia minimamente invasiva guiada por ultrassom e com aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP, CAAE: 30364720.0.0000.0068 e número do Parecer: 4.204.661. Esse parecer aprovou a inclusão da pesquisa e dos nomes dos pesquisadores do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP (ACAL e LVRFSF). Assim como, aceitou a dispensa, solicitada, de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visto que os casos são, na maioria, óbitos de vários anos, obtidos por meio de autópsias para fins de diagnóstico. A anonimidade e confidencialidade dos pacientes foi mantida em todas as etapas do estudo, e não houve riscos ou consequências para o paciente ou seus familiares.

4. RESULTADOS

Inicialmente, foram selecionados cerca de 500 laudos de autópsia; desses, cerca de 100 apresentavam tecido pulmonar emblocado em parafina, dos quais foram realizadas lâminas coradas em HE, analisados por patologista experiente (Prof^a. Dr^a. Thais Mauad), sendo selecionados 48 casos de paciente menores de 20 anos.

Portanto, a população de estudo foi composta por 94 pacientes, sendo 48 crianças com idades de recém-nascidos a 19 anos, divididas em cinco faixas etárias; 21 adultos de 20 a 59 anos, com 14 apresentando COVID-19; 25 idosos de 60 a 95 anos, em que 14 estavam infectados pelo SARS-CoV-2, descritos na Tabela 1. As comorbidades e as causas de óbito estão descritas na Tabela S1.

Tabela 1 – População de estudo.

Características	Casos n (sexo)
Sexo (F/M)	(39/55)
Crianças	
0-1 ano	11(6/5)
≥ 2-5 anos	10(2/8)
≥ 6-10 anos	9(6/3)
≥ 11-15 anos	10(3/7)
≥ 16-19 anos	8(2/6)
Adultos (20-59 anos)	
Com COVID-19	14(6/8)
Sem COVID-19	7(2/5)
Idosos (≥ 60 anos)	
Com COVID-19	14(5/9)
Sem COVID-19	11(6/5)
Total	94

n, número; ≥ , maior ou igual; **M**, masculino; **F**, feminino.

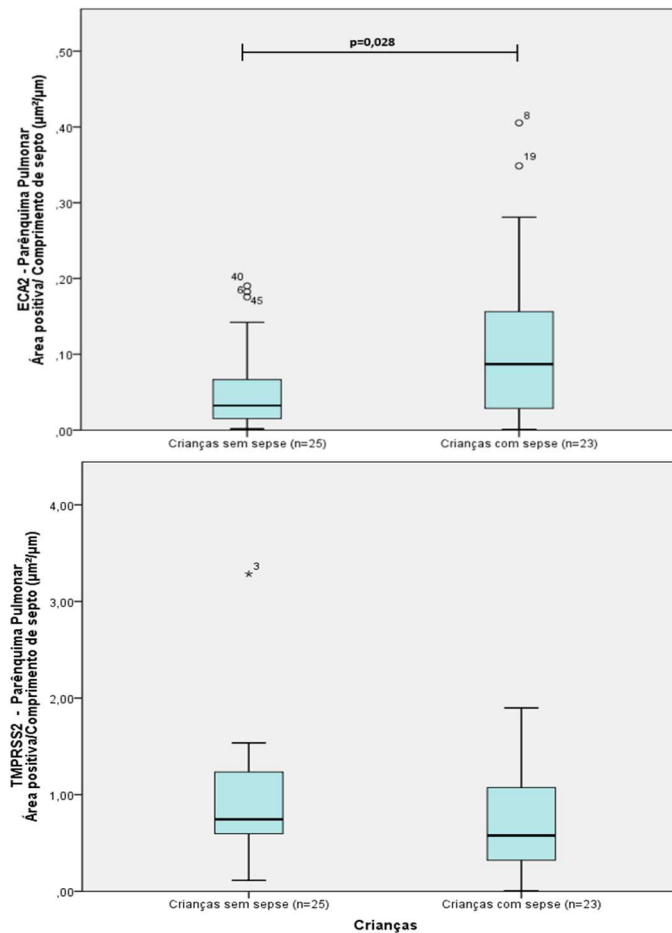
No grupo pediátrico, vinte e três apresentavam sepse como condição associada ao óbito; enquanto as não acometidas pela disfunção abrangiam 25 pacientes (Tabela 2). No grupo de pacientes pediátricos com sepse, a expressão da proteína ECA2 nos alvéolos foi superior à observada nas amostras de indivíduos sem sepse ($p=0,028$), mas não se identificou diferença para a expressão da proteína TMPRSS2 entre os grupos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas vias aéreas para as proteínas ECA2 e TMPRSS2 entre os grupos com ou sem sepse. (Figura 1, Tabela S2).

Tabela 2 – Crianças sem sepse

Características	Casos n
Sexo (F/M)	(11/14)
Crianças	
0-1 anos	5 (3/2)
≥ 2-5 anos	5 (1/4)
≥ 6-10 anos	6 (3/3)
≥ 11-15 anos	5 (3/2)
≥ 16-19 anos	4 (1/3)
Total	25

n, número; ≥, maior ou igual; F, feminino; M, masculino.

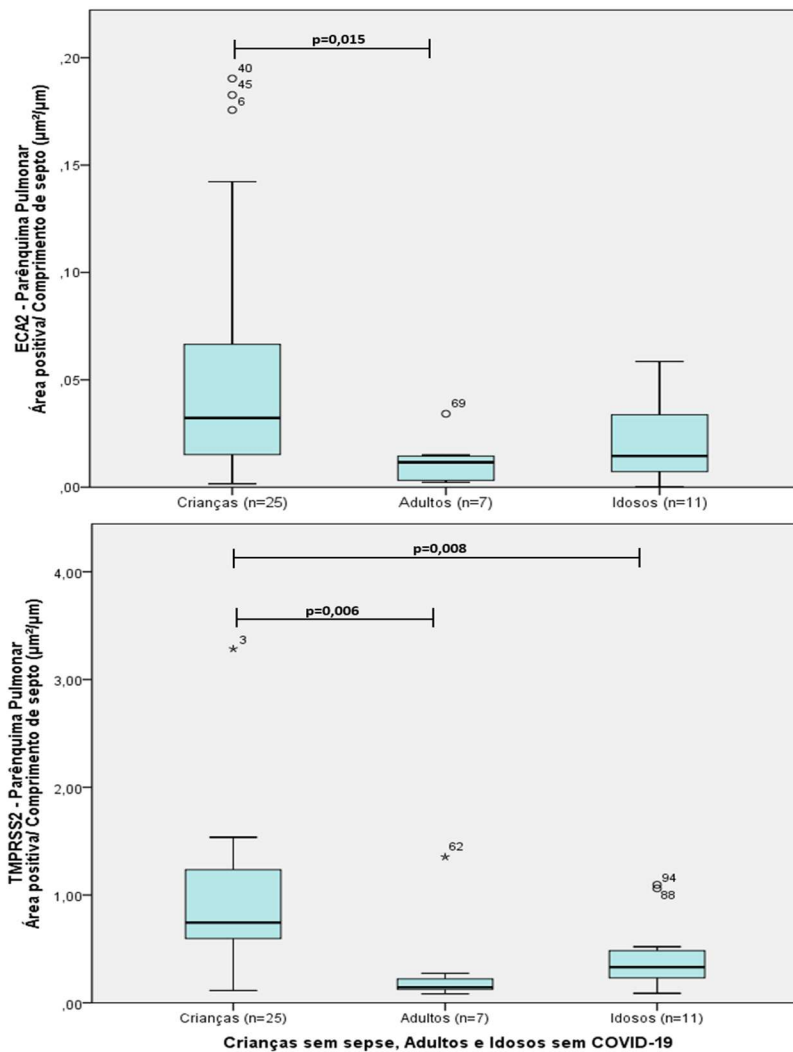
Figura 1 – Expressão de ECA2 e TMPRSS2 no parênquima pulmonar de crianças sem e com sepse.



Quando comparadas com adultos e idosos, foi observada maior expressão das proteínas ECA2 e TMPRSS2 no parênquima pulmonar das crianças sem sepse do que nos adultos ($p=0,015$ e $p=0,006$, respectivamente). Em relação aos idosos, foi identificada maior expressão de TMPRSS2 nos alvéolos das crianças ($p=0,008$) (Figura 2), assim como maior expressão na via aérea cartilaginosa delas ($p=0,044$).

Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de ECA2 e TMPRSS2 nas vias aéreas de crianças sem sepse quando comparadas ao grupo de adultos (Tabela S3).

Figure 2 – Expressão de ECA2 e TMPRSS2 no parênquima pulmonar de crianças sem sepse, adultos e idosos.



Houve uma correlação positiva moderada entre cada uma das proteínas ECA2 e TMPRSS2, parênquima pulmonar e via aérea não cartilaginosa ($p=0.036$, $p=0.039$, respectivamente) e entre ambas as vias aéreas ($p=0.039$, $p=0.006$, respectivamente) da faixa etária pediátrica. Nos adultos/idosos foi observada uma correlação positiva moderada entre TMPRSS2, parênquima pulmonar e na via aérea não cartilaginosa ($p=0.042$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Correlação entre o parênquima pulmonar e a via aérea nas crianças e adultos/idosos.

Estrutura	Marcador		Crianças	Adultos/Idosos
Parênquima pulmonar vs VANC	ECA2	<i>R</i>	0.512	0.117
		<i>p</i>	0.036	0.765
		<i>n</i>	17	9
Parênquima pulmonar vs VAC	ECA2	<i>R</i>	0.296	0.029
		<i>p</i>	0.283	0.957
		<i>n</i>	15	6
VANC vs VAC	ECA2	<i>R</i>	0.577	0.400
		<i>p</i>	0.039	0.600
		<i>n</i>	13	4
Parênquima pulmonar vs VANC	TMPRSS2	<i>R</i>	0.630	0.683
		<i>p</i>	0.007	0.042
		<i>n</i>	17	9
Parênquima pulmonar vs VAC	TMPRSS2	<i>R</i>	0.464	0.371
		<i>p</i>	0.095	0.468
		<i>n</i>	14	6
VANC vs VAC	TMPRSS2	<i>R</i>	0.741	0.600
		<i>p</i>	0.006	0.400
		<i>n</i>	12	4
Parênquima pulmonar	ECA2 vs TMPRSS2	<i>R</i>	-0.181	0.003
		<i>p</i>	0.387	0.990
		<i>n</i>	25	18
VANC	ECA2 vs TMPRSS2	<i>R</i>	0.110	0.017
		<i>p</i>	0.673	0.966
		<i>n</i>	17	9
VAC	ECA2 vs TMPRSS2	<i>R</i>	0.455	-0.429
		<i>p</i>	0.102	0.397
		<i>n</i>	14	6

VAC, via aérea cartilaginosa; VANC, via aérea não cartilaginosa; ECA2 enzima conversora de angiotensina 2; TMPRSS2, protease transmembrana de serina 2.

A análise comparativa da expressão das proteínas ECA2 e TMPRSS2 entre as diferentes faixas etárias de crianças e adolescentes sem sepse não revelou diferenças estatisticamente significativas no parênquima pulmonar ou vias aéreas. (Figura 3, Tabelas 4 e 5).

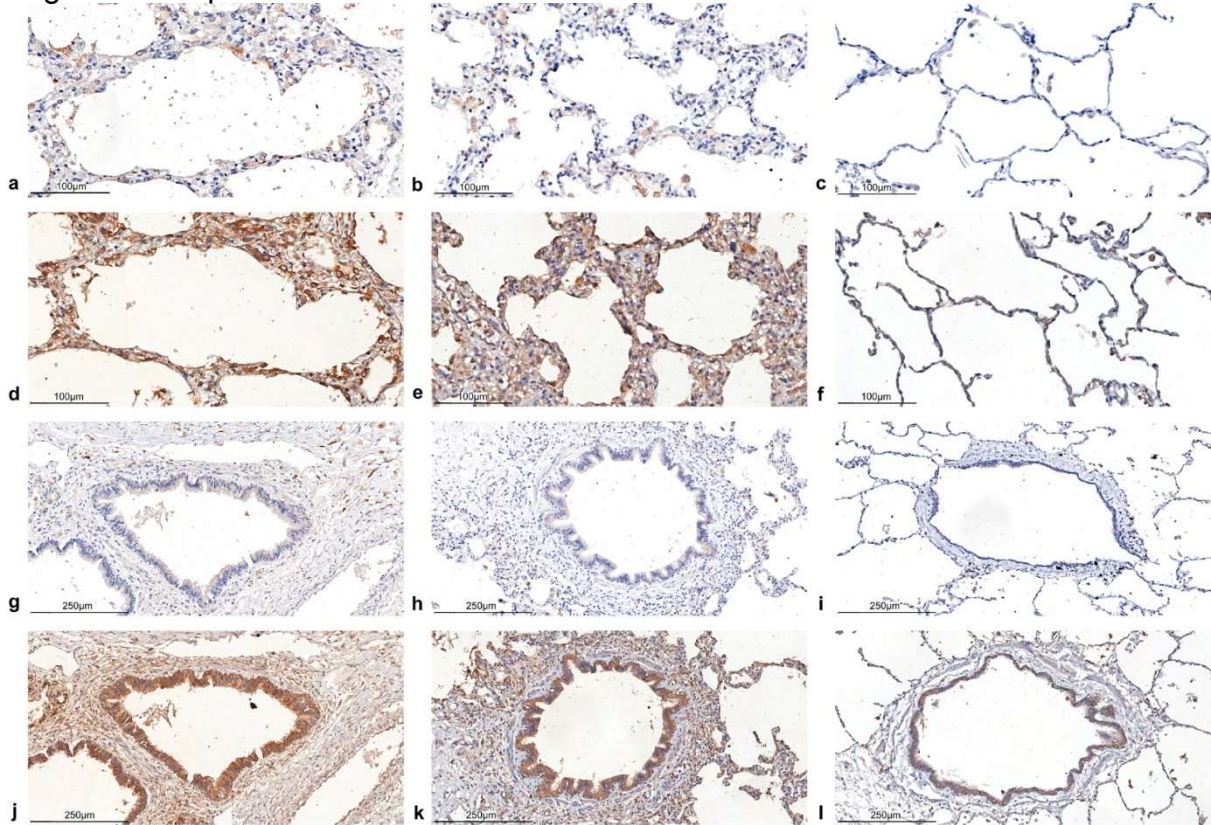
Figura 3 – Expressão de ECA2 e TMPRSS2 no parênquima pulmonar nas faixas etárias de crianças sem sepse



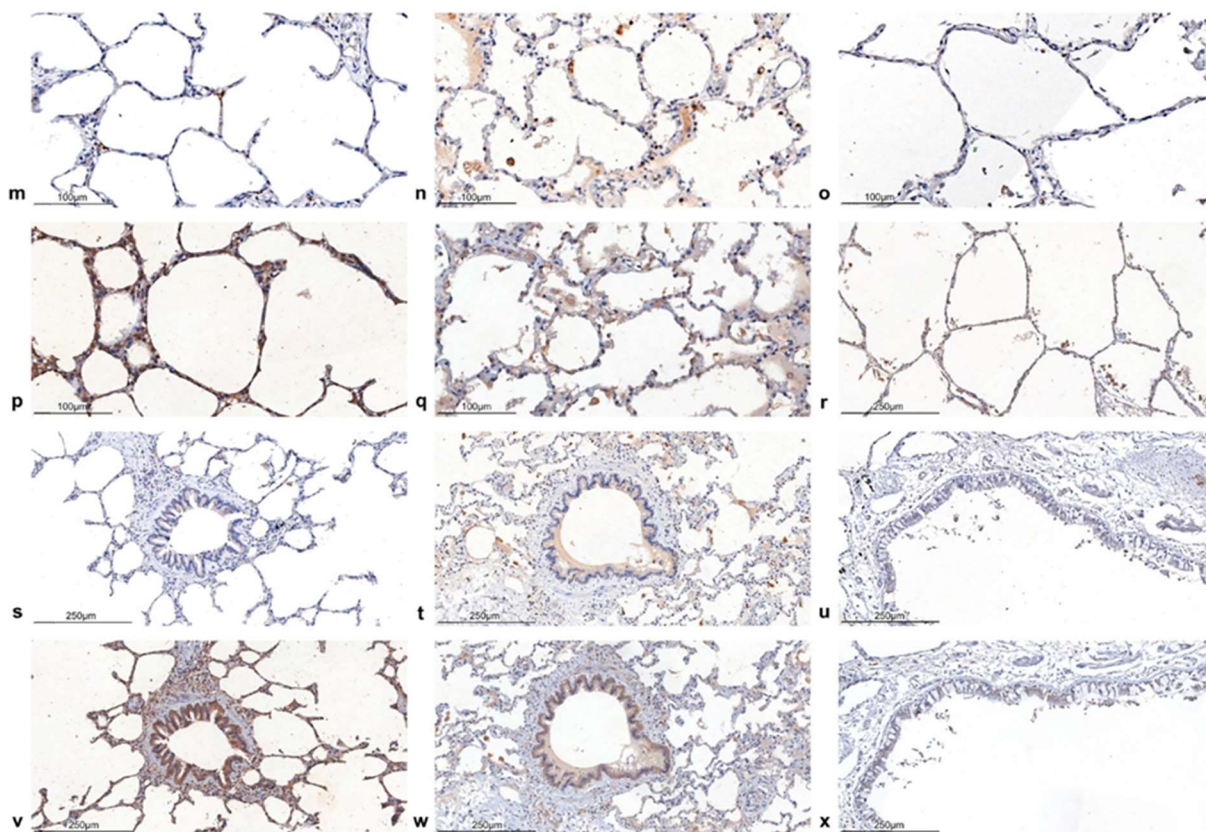
Comparando a expressão das proteínas ECA2 e TMPRSS2 entre as faixas etárias pediátricas com adultos, observou-se maior expressão da proteína ECA2 foi mais expressa no parênquima pulmonar de crianças de 0 a 1 ano e de 2 a 5 anos ($p=0,005$; $p=0,018$ respectivamente), enquanto maior expressão da proteína TMPRSS2 foi evidenciada na faixa etária de 0 a 1 ano, 6 a 10 anos e 11 a 15 anos quando comparada aos adultos ($p=0,018$; $p=0,035$; $p=0,030$, respectivamente) (Figura 4). Os idosos apresentaram menor expressão de ECA2 e TMPRSS2 no parênquima pulmonar em relação às crianças de 0 a 1 ano de idade ($p=0,019$ e $p=0,005$, respectivamente), menor expressão de TMPRSS2 do que o grupo de

crianças de 6 a 10 anos ($p=0,037$) (Tabela 4). Para ambas as proteínas, não houve diferenças significativas na expressão entre as faixas etárias das crianças, os adultos e os idosos nas vias aéreas (Tabela 5).

Figura 4 – Expressão de ECA2 e TMPRSS2 em diferentes idades.



Continua



ECA2-alvéolos a: recém-nascido, b: 3 anos, c: 38 anos. TMPRSS2-alvéolos d: recém-nascido, e: 3 anos, f: 38 anos. ECA2-via aérea g: recém-nascido, h: 3 anos, i: 38 anos. TMPRSS2-Via aérea: J: recém-nascido, K: 3 anos, L: 38 anos. ECA2-alvéolos m: 6 anos, n: 14 anos, o: 88 anos. TMPRSS2-alvéolos P: 6 anos, Q: 14 anos, R: 88 anos. ECA2-vias aéreas: 6 anos, t: 14 anos, u: 88 anos. TMPRSS2-via aérea: V: 6 anos, W: 14 anos, X: 88 anos.

Tabela 4 – Análise descritiva da ECA2 e TMPRSS2 no parênquima pulmonar de crianças sem sepse, adultos e idosos.

Parênquima Pulmonar					
Crianças sem sepse	N	ECA2		TMPRSS2	
		Mediana	IQR(25 – 75)	Mediana	IQR(25 – 75)
0-1 ano	5	0.067	(0.053 – 0.098)*,&	1.246	(0.723 – 1.527)#,\$
≥ 2-5 anos	5	0.027	(0.015 – 0.059)*	0.909	(0.470 – 0.982)
≥ 6-10 anos	6	0.017	(0.007 – 0.032)	0.686	(0.606 – 0.902)#,\$
≥ 11-15 anos	5	0.035	(0.031 – 0.076)	0.682	(0.659 – 1.235)#
≥ 16-19 anos	4	0.035	(0.006 – 0.122)	0.719	(0.175 – 1.350)
≥ 20-59 anos	7	0.012	(0.015 – 0.003)	0.144	(0.274 – 0.120)
≥ 60 anos	11	0.015	(0.035 – 0.005)	0.331	(0.520 – (0.167)

Os resultados são apresentados em mediana (IQR). As proteínas são apresentadas como uma área positiva pelo comprimento do septo ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). **ECA2**, receptor 2 da enzima conversora de angiotensina; **TMPRSS2**, serina transmembrana protease 2. ACE2 [*0-1anos, 2-5anos ≠ adultos (p=0.005; p=0.018, respectivamente). & 0-1 anos ≠ idosos (p=0,019).]; TMPRSS2 [# 0-1ano, 6-10anos, 11-15anos ≠ adultos (p=0.018; p=0.035; p=0,030 respectivamente). \$0-1anos e 6-10anos ≠ idosos (p=0,005; p=0,037, respectivamente)].

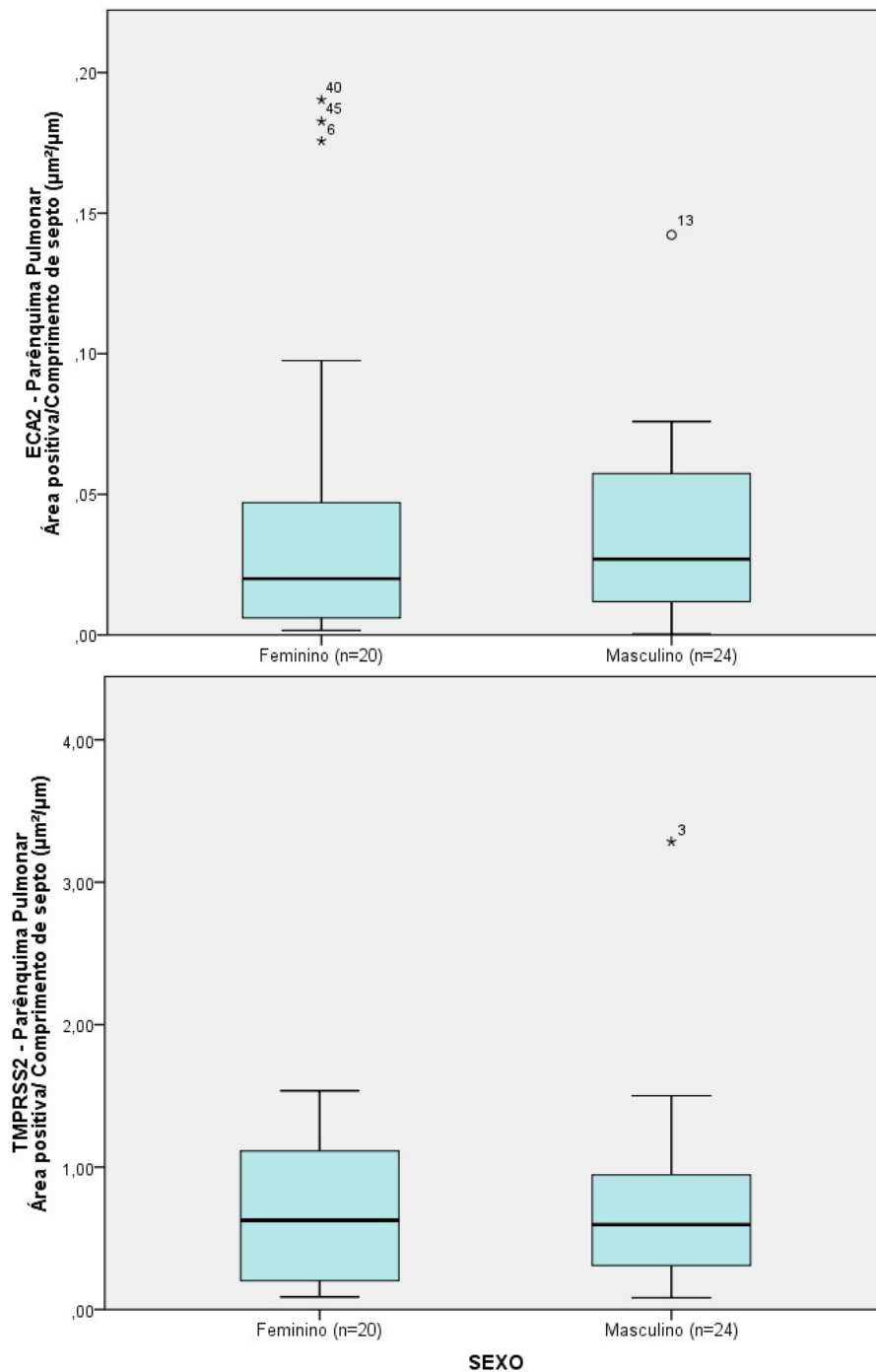
Tabela 5 – Análise descritiva da ECA2 e TMPRSS2 em vias aéreas de crianças sem sepse, adultos e idosos.

Crianças sem sepse	Vias aéreas não cartilaginosas						Vias aéreas cartilaginosas							
	N	Mediana	ECA2 IQR(25 – 75)		Mediana	TMPRSS2 IQR(25 – 75)		N	Mediana	ECA2 IQR(25 – 75)		Mediana	TMPRSS2 IQR(25 – 75)	
0-1ano	3	0.035	(0.009 – 0.056)		3.795	(1.527 – 9.680)		3	0.051	(0.022 – 0.172)		14.546	(1.321 – 16.663)	
≥ 2-5 anos	3	0.014	(0.001 – 0.037)		3.821	(1.616 – 5.463)		3	0.016	(0.000 – 0.017)		3.341	(2.146 – 5.864)	
≥ 6-10 anos	5	0.016	(0.010 – 0.017)		5.170	(5.057 – 5.274)		3	0.177	(0.015 – 0.278)		9.699	(4.374 – 10.446)	
≥ 11-15 anos	3	0.022	(0.008 – 0.036)		7.934	(5.044 – 11.194)		3	0.034	(0.014 – 0.051)		9.772	(5.598 – 17.398)	
≥ 16-19 anos	3	0.032	(0.012 – 0.201)		2.110	(0.095 – 9.340)		3	0.019	(0.010 – 0.064)		9.034	(3.299 – 14.768)	
≥ 20-59 anos	5	0.005	(0.002 – 0.012)		1.527	(1.200 – 5.042)		1	0.001	(0.001 – 0.001)		4.071	(4.071 – 4.071)	
≥ 60 anos	4	0.006	(0.002 – 0.013)		2.191	(1.001 – 4.402)		5	0.019	(0.012 – 0.024)		2.801	(0.745 – 3.726)	

Os resultados são apresentados em mediana (IQR). As proteínas são apresentadas como uma área positiva pelo comprimento do septo ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). **ECA2**, enzima conversora de angiotensina 2; **TMPRSS2**, serina protease transmembrana 2.

Não houve diferença na expressão das proteínas ECA2 e TMPRSS2 de acordo com o sexo dentro de cada faixa etária de crianças sem sepse (Tabela S4). Independentemente da idade, casos do sexo feminino não apresentaram diferença estatisticamente significativa na expressão das proteínas ECA2 e TMPRSS2 quando comparadas aos do grupo masculino (Figura 5, Tabela S5).

Figura 5 - ECA2 e TMPRSS2 no parênquima pulmonar feminino e masculino, independentemente da idade.



Considerando a idade, houve correlação negativa fraca entre o parênquima pulmonar e a ECA2 moderada a TMPRSS2 (R= - 0,499; p=0,001) (Tabela 6), em que quanto mais velhas, menor a expressão.

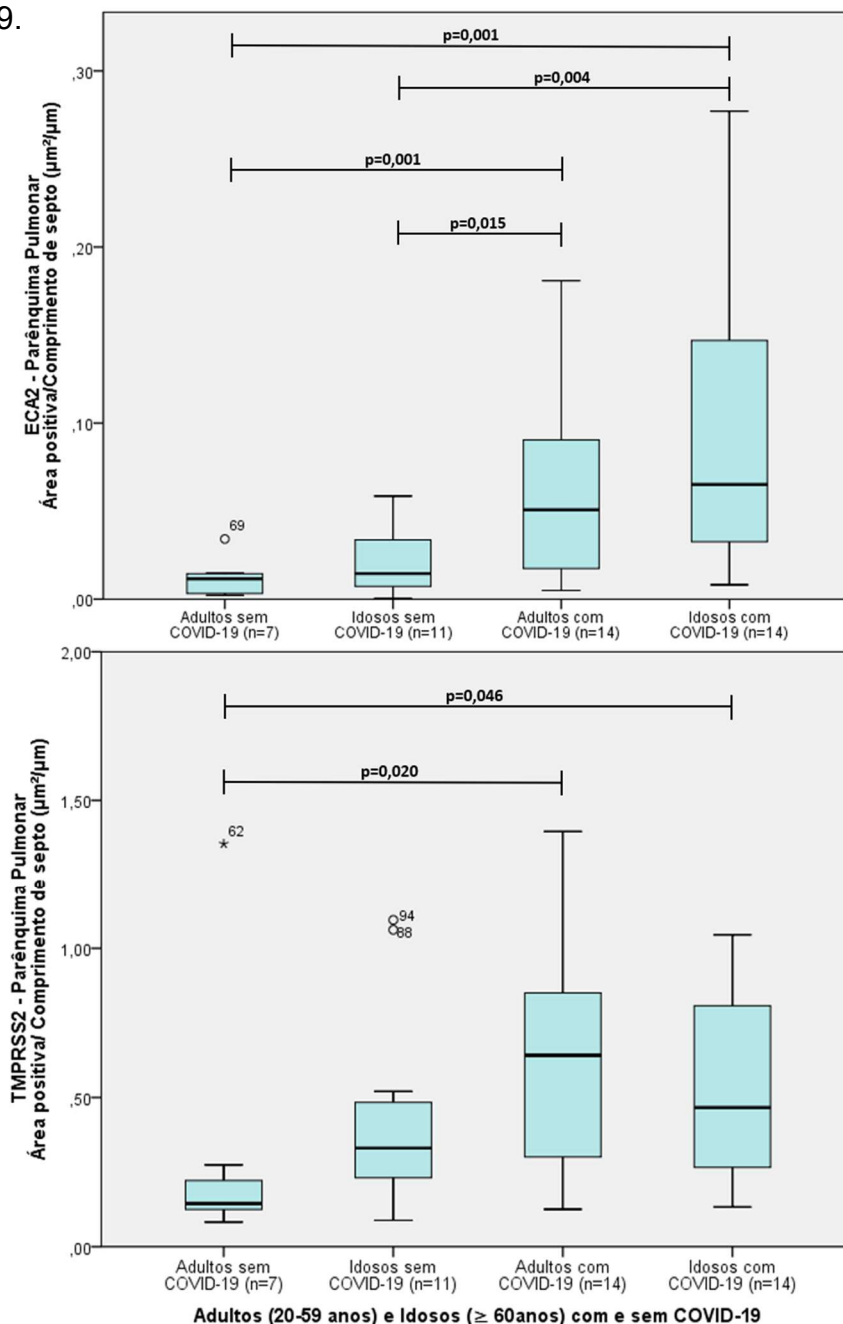
Tabela 6 – Correlação entre estruturas (parênquima pulmonar e vias aéreas), proteínas (ECA2 e TMPRSS2)

			Idade (0 a 95 anos) sem COVID-19	Parênquima Pulmonar		VANC	
				ECA2	TMPRSS2	ECA2	TMPRSS2
Parênquima Pulmonar	ECA2	<i>R</i>	- 0.338	1.000	0.046	0.485	0.14
		<i>p</i>	0.027	.	0.771	0.012	0.946
		<i>n</i>	43	43	43	26	26
	TMPRSS2	<i>R</i>	- 0.499	0.046	1.000	0.197	0.677
		<i>p</i>	0.001	0.771	.	0.334	0.000
		<i>n</i>	43	43	43	26	26
VANC	ECA2	<i>R</i>	- 0.368	0.485	0.197	1.000	0.196
		<i>p</i>	0.065	0.012	0.334	.	0.338
		<i>n</i>	26	26	26	26	26
	TMPRSS2	<i>R</i>	- 0.300	0.014	0.677	0.196	1.000
		<i>p</i>	0.137	0.946	0.000	0.338	.
		<i>n</i>	26	26	26	26	26
VAC	ECA2	<i>R</i>	- 0.242	0.295	0.214	0.515*	0.456
		<i>p</i>	0.291	0.195	0.351	0.035	0.066
		<i>n</i>	21	21	21	17	17
	TMPRSS2	<i>R</i>	- 0.278	0.027	0.612	0.103	0.759
		<i>p</i>	0.235	0.910	0.000	0.704	0.001
		<i>n</i>	20	20	20	16	16

VAC, via aérea cartilaginosa; VANC, via aérea não cartilaginosa; ECA2, enzima conversora de angiotensina 2; TMPRSS2, serina protease 2.

Em relação aos indivíduos acometidos por COVID-19, a expressão de ECA2 foi maior no parênquima pulmonar dos adultos e idosos com COVID-19 quando comparada a dos adultos ($p=0,001$ e $p=0,001$, respectivamente) e ao dos idosos ($p=0,015$ e $p=0,004$, respectivamente) sem COVID-19. Também houve maior presença de TMPRSS2 no parênquima pulmonar dos adultos ($p=0,020$) e no dos idosos ($p=0,046$) com COVID-19 quando comparado aos adultos sem COVID-19 (Figura 6).

Figura 6 – Expressão dos marcadores ECA2 e TMPRSS2 no parênquima pulmonar de adultos (20 a 59 anos de idade) e idosos (60 a 95 anos de idade) com e sem COVID-19.



DISCUSSÃO

No presente estudo, foi abordada a expressão proteica, no pulmão, do primer e do receptor do SARS-CoV-2. A expressão das proteínas TMPRSS2 e ECA2 foi maior nos alvéolos das crianças em comparação com os dos adultos, e não houve diferença considerável na expressão mensurada em amostras de vias aéreas entre as três faixas etárias. Esse resultado indica que uma expressão menor dessas proteínas na faixa etária pediátrica não seria um dos mecanismos pelos quais crianças apresentam menor frequência de quadros respiratórios graves quando infectadas pelo SARS-CoV-2.

Ao correlacionarmos a idade à expressão de ECA2 e TMPRSS2 no septo alveolar, observou-se redução da expressão dessas proteínas com o envelhecimento. Em pulmões de adultos e de idosos, a expressão de ECA2 é fracamente detectada (11, 12), e uma das hipóteses para COVID-19 ser frequentemente mais grave nesses grupos do que em crianças era que os menores de 20 anos de idade poderiam apresentar menos ECA2 e TMPRSS2 do que os indivíduos mais velhos (29, 30). Schurink *et al.* avaliaram qualitativamente a intensidade da imunomarcagem da ECA2 em alvéolos e vias aéreas de 15 crianças (de fetos a adolescentes) e pulmões de 5 adultos jovens e mostraram que a expressão de ECA2 aumentou gradativamente até atingir um platô aos 5 anos de idade (35). Silva *et al.* analisaram a porcentagem de positividade das colorações para ECA2 e TMPRSS2 em campos amostrais com pelo menos 450 pneumócitos tipo II no parênquima pulmonar de 21 crianças, 26 adultos e 29 idosos, classificando a intensidade corada de 1+ a 3+. Este estudo revelou que a ECA2 foi menos expressa em alvéolos de crianças do que em de adultos e idosos, e TMPRSS2 não apresentou diferença entre as faixas etárias (34).

No entanto, observamos em nossas análises que não apenas a ECA2, mas também TMPRSS2 foi mais expressa no parênquima pulmonar de crianças. Esses achados estão alinhados com os descritos por Ortiz *et al.*, que classificaram o número de células positivas para ECA2 de 0, 1 (menos de 1%), 2 (1-33%) a 4 (>66%) em uma das do estudo e revelaram que essa proteína era mais expressa em 6 pulmões de crianças do que em 23 de adultos/idosos (13). Da mesma forma, também similares à descrição de Zhang *et al.* que quantificou as células positivas para ECA2 (em todas as lâminas com marcação positiva) como o número médio de células por 0,025 cm² de tecido pulmonar em 26 crianças menores de 12 anos e 24 adultos/idosos, observando que essa proteína foi mais expressa nos pulmões das crianças e declinou

progressivamente quando agruparam as amostras em 0-10, 10-50, 50-60, 60-70 e >70 anos, sem diferença entre os dois primeiros grupos (36). Ao optarmos por um método quantitativo, nossos resultados trazem maior acurácia ao demonstrar maior expressão de ECA2 e TMPRSS2 no parênquima pulmonar das crianças sem sepse em relação aos adultos e idosos, das crianças com sepse em relação às sem sepse, bem como nos alvéolos dos adultos e idosos com COVID-19 em relação aos sem essa infecção.

Entre as limitações da nossa pesquisa, podemos citar o número reduzido de casos, limitada ainda por fatores inerentes à amostra de autópsias, como a dificuldade de encontrar tecido pulmonar próximo ao normal. No entanto, foi possível obter um número aceitável de amostras abrangendo a população infantil e de adolescentes. A maioria dos casos selecionados possuía comorbidades, o que poderia afetar a expressão das proteínas como evidenciado nos pacientes diagnosticados com sepse ou COVID-19. A escolha de uma técnica digital e quantitativa é um dos aspectos diferenciais do estudo, contudo foi utilizada por uma única observadora (com supervisão), o que poderia introduzir um viés nos resultados descritos. Por outro lado, a despeito dessa técnica poder trazer maior confiabilidade nos resultados, ela difere do método utilizado nos outros estudos, o que pode dificultar a comparação.

Evidenciamos que a sepse aumenta a expressão de ECA2 e TMPRSS2 no parênquima pulmonar das crianças, e que a COVID-19 aumenta a expressão dessas proteínas nos pulmões de adultos e idosos. Em estudos em camundongos submetidos a *knockout* para ECA2, há o desenvolvimento de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) quando submetidos à lesão pulmonar por ácido (7, 38) e quando infectados com o vírus respiratório sincicial (VSR) (39); revelando que a ECA2 age como um fator protetor contra a lesão pulmonar aguda. Dessa forma, a ECA2 elevada na sepse e na COVID-19 poderia ser um *feedback* positivo para reduzir as lesões causadas pelo desequilíbrio do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona; desbalanço que se desenvolve durante a SDRA.

Sabe-se que a TMPRSS2 é regulada por andrógenos e está aumentada no câncer de próstata dependente desses hormônios, mas a função dessa proteína ainda não é claramente conhecida na fisiologia humana. (17, 40) No entanto, não se evidenciou expressão diferente de ambas as proteínas entre os sexos feminino e masculino. Por conseguinte, a expressão dessas proteínas, principalmente da

TMPRSS2, não deve ser a causa de maior frequência de COVID-19 grave entre pacientes do sexo masculino (41, 42).

Embora os adultos e idosos tenham apresentado menor expressão de ECA2 no parênquima pulmonar quando comparados ao das crianças sem sepse de 0 a 1 ano de idade, não houve diferença entre as diferentes faixas etárias pediátricas. Em camundongos recém-nascidos, a ECA2 é mais expressa do que em camundongos adultos (14, 43). Um estudo *in vitro* evidenciou também que, em ambiente de hipóxia, como o que ocorre em recém-nascidos e em crianças com bronquiolite viral aguda, a ECA2 também estimula o eixo SIRT1/eNOS, aumentando o óxido nítrico (NO) que promove a liberação de surfactante em cultura de células alveolares tipo II (44). Presumivelmente, se o parênquima pulmonar das crianças apresenta mais ECA2, essa proteína poderia atuar evitando o desenvolvimento da COVID-19 pulmonar grave nesse grupo etário. Entretanto, essa ação protetora no tecido pulmonar humano infectado pelo SARS-CoV-2 ainda é desconhecida (38, 45).

Os resultados do presente estudo permitem refutar a hipótese de que a expressão proteica de ECA2 e TMPRSS2 seria menor em tecido pulmonar das crianças. Zimmermann *et.al* considerou a expressão menor dessas proteínas como uma teoria não tão relevante para o fato observado de que os casos pediátricos de COVID-19, em sua maioria, serem menos graves (29). Provavelmente, o sistema imunológico das crianças agiria, na infecção por SARS-CoV-2, por meio de mecanismos e vias diferentes dos de indivíduos mais velhos. Essa hipótese englobaria o amadurecimento do sistema imune durante a infância, em que o sistema imune inato se apresenta mais ativo nas mucosas, com maior contato com vírus e outros microrganismos, além da maior frequência da vacinação; dessa maneira, as crianças conseguiriam eliminar com mais efetividade esse vírus (29, 30).

Poucos estudos avaliaram a expressão de ECA2 e TMPRSS2 em indivíduos com menos de 20 anos. Há ainda uma escassez de dados sobre a expressão dessas proteínas em tecido pulmonar de lactentes e pré-escolares, mesmo sendo a proteína TMPRSS2 um *primer* para o metapneumovírus humano (19) e para o vírus parainfluenza humano (20). Ainda não se sabe se a maior presença de ECA2 nos alvéolos representa um fator de proteção para infecções pulmonares mais graves por vírus. Conseqüentemente, estudos sobre a função dessas proteínas no pulmão de

crianças poderiam auxiliar na produção de novas vacinas e medicamentos, a fim de prevenir e tratar as doenças respiratórias tão prevalentes e indutoras de comorbidades na população pediátrica.

Nossos resultados, portanto, evidenciaram que a ECA2 e a TMPRSS2 são mais expressas no parênquima pulmonar de crianças, sem diferença nas vias aéreas considerando a idade. Novas pesquisas, principalmente na faixa etária pediátrica, são necessárias para entender o papel dessas proteínas nos pulmões e compreender as diferentes evoluções da COVID-19 entre as diferentes faixas etárias. O presente estudo revelou-se ainda importante pela contribuição na criação de um banco de casos pediátricos no acervo do Departamento de Patologia. Sua realização pode estimular outros pesquisadores a seguir essa linha de investigação, com o emprego de métodos padronizados e reprodutíveis, bem como incluindo técnicas novas e mais avançadas. Adicionalmente, ilustra a importância de iniciativas de pesquisas colaborativas entre diferentes especialidades médicas, com compartilhamento de amostras e de dados, aspectos essenciais para a evolução da medicina, da ciência e do conhecimento humano.

6. CONCLUSÕES:

1. A expressão das proteínas ECA2 e TMPRSS2 nos alvéolos foi menor com o aumento da faixa etária analisada, o que não foi observado nas amostras de vias aéreas.
2. A proteína ECA2 foi mais expressa no parênquima pulmonar das crianças com sepse em relação às sem sepse.
3. Em comparação com as crianças sem sepse, observou-se menor expressão de ambas as proteínas nos alvéolos dos adultos, e a proteína TMPRSS2 foi menos expressa nos alvéolos dos idosos, não se identificando diferença considerável para a expressão das duas proteínas nas vias aéreas entre as três faixas etárias.
4. Não houve diferença significativa na expressão das proteínas ECA2 e TMPRSS2 entre as diferentes faixas etárias pediátricas (crianças sem sepse), mas as amostras de adultos e idosos apresentaram menor expressão de ECA2 e TMPRSS2 nos alvéolos em relação às crianças sem sepse de 0 a 1 ano de idade.
5. Não houve diferença significativa na expressão de ambas as proteínas no parênquima pulmonar e nas vias aéreas entre os sexos, e entre as amostras de adultos e idosos.
6. A expressão de ambas as proteínas foi mais elevada nos alvéolos de adultos e idosos com COVID-19, quando comparada à observada nos indivíduos sem a infecção.

REFERÊNCIAS

1. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020;181(2):281-92 e6.
2. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Kruger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-80 e8.
3. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-3.
4. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23(1):3-20.
5. Pinto AL, Rai RK, Brown JC, Griffin P, Edgar JR, Shah A, et al. Ultrastructural insight into SARS-CoV-2 entry and budding in human airway epithelium. *Nat Commun*. 2022;13(1):1609.
6. Lambert DW, Clarke NE, Turner AJ. Not just angiotensinases: new roles for the angiotensin-converting enzymes. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(1):89-98.
7. Imai Y, Kuba K, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(15):2006-12.
8. Yamaguchi T, Hoshizaki M, Minato T, Nirasawa S, Asaka MN, Niiyama M, et al. ACE2-like carboxypeptidase B38-CAP protects from SARS-CoV-2-induced lung injury. *Nat Commun*. 2021;12(1):6791.
9. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 2000;275(43):33238-43.
10. Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, Lely AT, Navis G, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol*. 2004;203(2):631-7.
11. Hikmet F, Mear L, Edvinsson A, Micke P, Uhlen M, Lindskog C. The protein expression profile of ACE2 in human tissues. *Mol Syst Biol*. 2020;16(7):e9610.
12. Honzke K, Obermayer B, Mache C, Fathykova D, Kessler M, Dokel S, et al. Human lungs show limited permissiveness for SARS-CoV-2 due to scarce ACE2 levels but virus-induced expansion of inflammatory macrophages. *Eur Respir J*. 2022;60(6).
13. Ortiz ME, Thurman A, Pezzulo AA, Leidinger MR, Klesney-Tait JA, Karp PH, et al. Heterogeneous expression of the SARS-Coronavirus-2 receptor ACE2 in the human respiratory tract. *EBioMedicine*. 2020;60:102976.
14. Inde Z, Croker BA, Yapp C, Joshi GN, Spetz J, Fraser C, et al. Age-dependent regulation of SARS-CoV-2 cell entry genes and cell death programs correlates with COVID-19 severity. *Sci Adv*. 2021;7(34).
15. Jia HP, Look DC, Shi L, Hickey M, Pewe L, Netland J, et al. ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. *J Virol*. 2005;79(23):14614-21.

16. Serfozo P, Wysocki J, Gulua G, Schulze A, Ye M, Liu P, et al. Ang II (Angiotensin II) Conversion to Angiotensin-(1-7) in the Circulation Is POP (Prolyl oligopeptidase)-Dependent and ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2)-Independent. *Hypertension*. 2020;75(1):173-82.
17. Lucas JM, Heinlein C, Kim T, Hernandez SA, Malik MS, True LD, et al. The androgen-regulated protease TMPRSS2 activates a proteolytic cascade involving components of the tumor microenvironment and promotes prostate cancer metastasis. *Cancer Discov*. 2014 Nov;4(11):1310-25.
18. Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M, Taguchi F. Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *J Virol*. 2010;84(24):12658-64.
19. Shirogane Y, Takeda M, Iwasaki M, Ishiguro N, Takeuchi H, Nakatsu Y, et al. Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2. *J Virol*. 2008;82(17):8942-6.
20. Abe M, Tahara M, Sakai K, Yamaguchi H, Kanou K, Shirato K, et al. TMPRSS2 is an activating protease for respiratory parainfluenza viruses. *J Virol*. 2013;87(21):11930-5.
21. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419.
22. Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, Mbanjo IM, Miao VN, Tzouanas CN, et al. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. *Cell*. 2020;181(5):1016-35 e19.
23. Lu X, Zhang L, Du H, Zhang J, Li YY, Qu J, et al. SARS-CoV-2 Infection in Children. *N Engl J Med*. 2020;382(17):1663-5.
24. Hong H, Wang Y, Chung HT, Chen CJ. Clinical characteristics of novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) in newborns, infants and children. *Pediatr Neonatol*. 2020;61(2):131-2.
25. Dong Y, Mo X, Hu Y, Qi X, Jiang F, Jiang Z, Tong S. Epidemiology of COVID-19 Among Children in China. *Pediatrics*. 2020;145(6).
26. Nikolopoulou GB, Maltezou HC. COVID-19 in Children: Where do we Stand? *Arch Med Res*. 2022;53(1):1-8.
27. Forbes H, Morton CE, Bacon S, McDonald HI, Minassian C, Brown JP, et al. Association between living with children and outcomes from covid-19: OpenSAFELY cohort study of 12 million adults in England. *BMJ*. 2021;372:n628.
28. Lessler J, Grabowski MK, Grantz KH, Badillo-Goicoechea E, Metcalf CJE, Lupton-Smith C, et al. Household COVID-19 risk and in-person schooling. *Science*. 2021;372(6546):1092-7.
29. Zimmermann P, Curtis N. Why Does the Severity of COVID-19 Differ With Age?: Understanding the Mechanisms Underlying the Age Gradient in Outcome Following SARS-CoV-2 Infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2022;41(2):e36-e45.

30. Rotulo GA, Palma P. Understanding COVID-19 in children: immune determinants and post-infection conditions. *Pediatr Res.* 2023;94(2):434-42.
31. Bunyavanich S, Do A, Vicencio A. Nasal Gene Expression of Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Children and Adults. *JAMA.* 2020;323(23):2427-9.
32. Saheb Sharif-Askari N, Saheb Sharif-Askari F, Alabed M, Temsah MH, Al Heialy S, Hamid Q, Halwani R. Airways Expression of SARS-CoV-2 Receptor, ACE2, and TMPRSS2 Is Lower in Children Than Adults and Increases with Smoking and COPD. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020;18:1-6.
33. Muus C, Luecken MD, Eraslan G, Sikkema L, Waghray A, Heimberg G, et al. Single-cell meta-analysis of SARS-CoV-2 entry genes across tissues and demographics. *Nat Med.* 2021;27(3):546-59.
34. Silva MG, Falcoff NL, Corradi GR, Di Camillo N, Seguel RF, Tabaj GC, et al. Effect of age on human ACE2 and ACE2-expressing alveolar type II cells levels. *Pediatr Res.* 2023;93(4):948-52.
35. Schurink B, Roos E, Vos W, Breur M, van der Valk P, Bugiani M. ACE2 Protein Expression During Childhood, Adolescence, and Early Adulthood. *Pediatr Dev Pathol.* 2022;25(4):404-8.
36. Zhang Z, Guo L, Huang L, Zhang C, Luo R, Zeng L, et al. Distinct Disease Severity Between Children and Older Adults With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Impacts of ACE2 Expression, Distribution, and Lung Progenitor Cells. *Clin Infect Dis.* 2021;73(11):e4154-e65.
37. Buttignol M, Pires-Neto RC, Rossi ESRC, Albino MB, Dolhnikoff M, Mauad T. Airway and parenchyma immune cells in influenza A(H1N1)pdm09 viral and non-viral diffuse alveolar damage. *Respir Res.* 2017;18(1):147.
38. Kuba K, Yamaguchi T, Penninger JM. Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) in the Pathogenesis of ARDS in COVID-19. *Front Immunol.* 2021;12:732690.
39. Gu H, Xie Z, Li T, Zhang S, Lai C, Zhu P, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 inhibits lung injury induced by respiratory syncytial virus. *Sci Rep.* 2016;6:19840.
40. Epstein RJ. The secret identities of TMPRSS2: Fertility factor, virus trafficker, inflammation moderator, prostate protector and tumor suppressor. *Tumour Biol.* 2021;43(1):159-176. doi: 10.3233/TUB-211502. PMID: 34420994.
41. Wang A, Chiou J, Poirion OB, Buchanan J, Valdez MJ, Verheyden JM, et al. Single-cell multiomic profiling of human lungs reveals cell-type-specific and age-dynamic control of SARS-CoV2 host genes. *Elife.* 2020;9.
42. Prevention CDC. Centers for Disease Control and Prevention. COVID Data Tracker. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2023, August 29. <https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker>.
43. Shahbaz S, Oyegbami O, Saito S, Osman M, Sligl W, Elahi S. Differential effects of age, sex and dexamethasone therapy on ACE2/TMPRSS2 expression and susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *Front Immunol.* 2022;13:1021928.

44. Xu H, Xiao J. ACE2 Promotes the Synthesis of Pulmonary Surfactant to Improve AT II Cell Injury via SIRT1/eNOS Pathway. *Comput Math Methods Med.* 2021;2021:7710129.
45. Gheware A, Ray A, Rana D, Bajpai P, Nambirajan A, Arulsevi S, et al. ACE2 protein expression in lung tissues of severe COVID-19 infection. *Sci Rep.* 2022;12(1):4058.

Apêndice Tabela A1 – Comorbidades e Causas de óbito dos pacientes.

Caso	Idade	Sexo	Comorbidades	Causa do óbito
1	6 dias	F	Mielomenigocele extensa rota Luxação congênita do quadril bilateral Pé torto congênito	Choque séptico (sepse neonatal tardia)
2	10 dias	F	Malformações cardiovasculares: Atresia mitral, hipoplasia extrema do ventrículo esquerdo, isomerismo atrial, hipoplasia de aorta descendente, CIV (3mm), miocardiopatia hipertrófica, hipoplasia de valva pulmonar e BAV 2:1.	Insuficiência cardíaca congestiva
3	11 dias	M	Erro inato do metabolismo-defeito do ciclo da uréia	Insuficiência Renal, Hepática, Respiratória
4	15 dias	M	Prematuridade (33semanas+1dia), Mielomenigocele corrigida intraútero (com 23 semanas de gestação), hidrocefalia com derivação ventrículo-peritoneal (PO 3 na data do óbito), Regurgitação e broncoapiração (pneumonite intersticial focal)	Insuficiência Respiratória
5	17 dias	M	Multiplas malformações congênitas (megabexiga, rim esquerdo atrófico, hidronefrose à direita grau IV, genitália ambígua e disgenesia gonadal, fistula enterogenital, ânus imperfurado) Restrição torácica por volume abdominal aumentado. 15° PO de colostomia e vesicostomia, 11° PO de urostomia.	Choque séptico (foco peritoneal) com CIVD
6	1 mês e 3 dias	F	Rabdomioma cardíaco com quimioterapia (Aventada hipótese de Esclerose tuberosa)	Insuficiência cardíaca
7	1 mês e 19 dias	F	Evidências de prematuridade à histologia: pulmão com septos alargados, com vasos proeminentes, desprovidos de revestimento epitelial adequado	Edema cerebral Gastroenterocolite por rotavírus
8	5 meses	F	Doença hepática crônica com intenso grau de colestase e doença ductopenica estadio IV. Cisto de colédoco operado (34° PO)	Choque séptico por colangite aguda
9	1 ano e 5 meses	F	Leucemia mieloide aguda pós-TMO	Choque hipovolêmico por Hemorragia digestiva aguda
11	1 ano e 9 meses	M		Insuficiência Hepática por Hepatite aguda por herpesvírus I e II
10	1 ano	M	Tumor embrionário indiferenciado de sistema nervoso central, provavelmente meduloblastoma	Hipertensão intracraniana
12	2 anos	M	Ependimoma intraventricular e intracerebral à esquerda	Edema Cerebral
13	2 anos	M	Linfoma de células B de alto grau em sistema nervoso central Imunodeficiência combinada Anemia hemolítica auto-imune com AVEI (8 meses antes do óbito)	Hipertensão intracrâniana
14	2 anos e 3 meses	M	Doença Neuromuscular a esclarecer Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor Hipotonia Infecção de trato urinário de repetição	Edema Cerebral Insuficiência Respiratória
15	2 anos e 3 meses	F	Sem comorbidades prévias	Meningococcemia Insuficiência e hemorragia adrenal Edema cerebral
16	2 anos e 8 meses	M	Neuroblastoma em supra-renal esquerda ressecado Metástase em calota óssea Medula óssea aplásica por quimioterapia neoadjuvante para TAMO	Choque séptico
17	3 anos	M	Leucemia Linfóide Aguda	Choque séptico por apendicite e peritonite agudas
18	3 anos	M	Síndrome de Klippel - Trenaunay - Weber Hemangiomas múltiplos	Edema cerebral após hemorragia por ruptura de hemangiomas
19	3 anos e 1 mês	M	Meningomielocele corrigida	Choque séptico por meningite aguda (obstrução de DVP)
20	3 anos e 2 meses	M	Nefropatia crônica (esclerose glomerular segmentar)	Insuficiência cardíaca (Indeterminado)
21	4 anos e 7 meses	F	Arterite de Takayasu Cardiomiopatia dilatada	Insuficiência cardíaca congestiva Edema agudo de pulmão

Caso	Idade	Sexo	Comorbidades	Causa do óbito
22	6 anos e 3 meses	F	Neuroblastoma estadio 4 com metástase linfonodal	Parada Cardiorrespiratório após crise convulsiva (Indefinida)
23	6 anos e 4 meses	M	Mielodisplasia	Hipertensão intracraniana por AVEH à direita
24	7 anos	M	Doença de Crohn	Choque hipovolêmico por Hemorragia Digestiva Alta e Baixa
25	7 anos	F	Dolicomegaacolon	Hemorragia digestiva por Gastroenterocolite aguda
26	7 anos e 3 meses	F	Doença autoimune sistêmica	Choque cardiogênico por microinfartos cardíacos
27	7 anos e 6 meses	F	Síndrome febril de origem indeterminada com pancitopenia e esplenomegalia Braquidactília	Edema cerebral
28	9 anos e 10 meses	F	Sem comorbidades prévias	Choque séptico por Gastroenterite aguda gangrenosa
29	10 anos	M	Neoplasia maligna indiferenciada de células pequenas cerebral	Edema cerebral
30	10 anos	F	Doença de Caroli Transplante e retransplante Hepático	Insuficiência hepática por Trombose de veia porta com choque hipovolêmico
31	11 anos	F	Hepatite autoimune fulminante Transplante hepático (PO imediato)	Insuficiência hepática com choque hipovolêmico
32	11 anos	M	Melanoma Meningeo	Edema Cerebral
33	12 anos	M	Anemia aplásica grave (18ª dia pós-TMO)	Hemorragia Digestiva Grave e sepse por peritonite bacteriana
34	12 anos	M	Carcionoma peritoneal Adenocarcinoma de ceco operado Iliostomia à direita	Choque séptico por Peritonite aguda
35	12 anos	F	Atresia de vias biliares extra hepáticas com cirrose hepática biliar Transplante hepático com rejeição crônica	Falência hepática
36	13 anos	M	Litíase renal	Choque séptico por Pielonefrite aguda
37	14 anos	M	Astrocitoma pilocítico operado Pneumotórax drenado	Astrocitoma pilocítico com sepse por gastroenterite
38	14 anos	M	Malformação arteriovenosa cerebral à direita	Choque distributivo Edema encefálico Hemorragia intraparenquimatosa
39	15 anos	M	Leucemia linfocítica aguda	Choque séptico Infecção disseminada
40	15 anos	F	Tumor de Frantz Operado (Tumor sólido pseudo papilífero pancreático) Hepatopatia Crônica Colestática	Edema Agudo de pulmão Esteatose hepática extensa
41	17 anos	M	Lúpus Eritematoso Sistêmico, Púrpura Trombocitopênica Trombótica, Acidente Vascular Cerebral isquêmico prévio, Hipotireoidismo, Asma Brônquica e Dermatite atópica	Hemorragia alveolar Coagulopatia
42	18 anos	M	Nasoangiofibroma operado	Choque hipovolêmico por Sangramento agudo em sítio operatório
43	18 anos	M	Linfoma linfoblástico T (Neoplasia de mediastino anterior)	Choque cardiogênico por Compressão extrínseca de mediastino Choque séptico
44	18 anos	M	Sem comorbidades prévias	Choque séptico por Apendicite aguda perforada
45	18 anos	F	Linfoma não-Hodgkin de grandes células B centro germinativo difuso	Choque circulatório
46	19 anos	F	Leucemia linfoide aguda de células B Miocardiopatia dilatada Transplante de medula óssea	Choque séptico (foco em medula óssea)
47	19 anos	M	Gastroenterite de etiologia indeterminada Desnutrição Proteico-Calórica	SIRS com distúrbio de coagulação
48	19 anos	M	Astrocitoma pilocítico, Hemorragia intracraniana	Edema cerebral

Caso	Idade	Sexo	Comorbidades	Causa do óbito
49	29 anos	M	Etilismo, Hepatopatia crônica	Pancreatite aguda
50	38 anos	M	Sem comorbidades	Hemopericárdio (Dissecção aguda de Aorta roto)
51	46 anos	M	Hipertensão arterial sistêmica, Cirrose hepática por etilismo	Broncopneumona bilateral (não evidenciada no anatomopatológico)
52	48 anos	M	Etilismo	Edema pulmonar
53	49 anos	F	Hipertensão arterial sistêmica, Cardiopatia hipertensiva	Edema pulmonar
54	58 anos	F	Cardiopatia	Edema agudo pulmonar
55	59 anos	M	Diabetes Mellitus, Hipertensão arterial sistêmica, Etilismo Síndrome de Guillain-Barré	Infarto agudo do miocárdio
56	60 anos	M	Diabetes Mellitus, Hipertensão arterial sistêmica	Infarto agudo do miocárdio
57	62 anos	M	Diabetes Mellitus, Hipertensão arterial sistêmica	Edema agudo pulmonar
58	66 anos	F	Diabetes Mellitus, Hipertensão arterial sistêmica, Acidente vascular cerebral	Acidente vascular cerebral isquêmico
59	73 anos	M	Diabetes Mellitus, Hipertensão arterial sistêmica	Infarto agudo do miocárdio
60	76 anos	F	Diabetes Mellitus, Hipertensão arterial sistêmica, Cardiopatia	Edema pulmonar
61	78 anos	M	Diabetes Mellitus, Hipertensão arterial sistêmica	Insuficiência cardíaca congestiva
62	81 anos	F	Diabetes Mellitus, Hipertensão arterial sistêmica, Demência	Pielonefrite aguda
63	87 anos	M	Diabetes Mellitus, Hipertensão arterial sistêmica, Cardiopatia, Distúrbio neurológico	Infarto agudo do miocárdio
64	87 anos	F	Carcinoma de duodeno avançado	Caquexia
65	88 anos	F	Diabetes Mellitus, Hipertensão arterial sistêmica, Mieloma múltiplo	Cardiopatia isquêmica
66	95 anos	F	Demência	Tromboembolia pulmonar

Caso com COVID-19	Idade	Sexo	Comorbidades	Causa do óbito
67	32 anos	M	Hipertensão Arterial Sistêmica, Obesidade grau II	COVID-19
68	32 anos	M	Tabagismo, Baixo Peso	COVID-19
69	33 anos	M	Diabetes Mellitus, Obesidade grau II	COVID-19
70	36 anos	F	Diabetes Mellitus, Asma, Imunossupressão	COVID-19
71	39 anos	F	Sobrepeso	COVID-19
72	41 anos	M	Hipertensão Arterial Sistêmica	COVID-19
73	43 anos	M	Sobrepeso	COVID-19
74	45 anos	M	Cardiopata	COVID-19
75	45 anos	M	Diabetes Mellitus, Hipertensão Arterial Sistêmica, Injúria Renal Crônica, Obesidade grau III	COVID-19
76	46 anos	F	Hipertensão Arterial Sistêmica, Sobrepeso, DPOC, ex-Tabagista	COVID-19
77	46 anos	F	Hipertensão Arterial Sistêmica, Imunossupressão	COVID-19
78	50 anos	M	Hipertensão Arterial Sistêmica, Injúria Renal Crônica, Mieloma múltiplo, Trombose, Obesidade grau I	COVID-19
79	53 anos	F	Diabetes Mellitus, Injúria Renal Crônica, Cardiopatia, Imunossupressão	COVID-19
80	55 anos	F	Câncer de Mama	COVID-19
81	63 anos	M	Ex-Tabagista	COVID-19
82	63 anos	F	Diabetes Mellitus, ex-Tabagista	COVID-19
83	64 anos	F	Hipertensão Arterial Sistêmica, Câncer de Mama, Cardiopatia, DPOC (ex-Tabagista), Sobrepeso	COVID-19
84	64 anos	M	Diabetes Mellitus, Hipertensão Arterial Sistêmica	COVID-19
85	67 anos	M	Hipertensão Arterial Sistêmica, Cardiopatia, ex-Tabagista	COVID-19
86	68 anos	M	Sobrepeso	COVID-19
87	69 anos	F	Sem comorbidades	COVID-19
88	69 anos	M	Hipertensão Arterial, AVC, DPOC (ex-tabagista), cardiopatia, Baixo Peso	COVID-19
89	71 anos	F	Diabetes Mellitus, Hipertensão Arterial Sistêmica, Cardiopatia, Asma	COVID-19
90	74 anos	M	Diabetes Mellitus, Hipertensão Arterial Sistêmica, Cardiopatia, IAM, Obesidade grau III	COVID-19
91	76 anos	M	Hipertensão Arterial, Obesidade grau I	COVID-19
92	79 anos	M	Diabetes Mellitus, Hipertensão Arterial Sistêmica, Injúria Renal Crônica, AVC, Cardiopatia, DPOC, Tabagista	COVID-19
93	83 anos	F	Diabetes Mellitus, Hipertensão Arterial Sistêmica, Cardiopatia, Tabagista	COVID-19
94	88 anos	M	Sobrepeso	COVID-19

Tabela A2 – Análise descritiva da expressão de ECA2 e TMPRSS2 nas vias aéreas de crianças com e sem sepse.

Crianças	N	Vias aéreas não cartilaginosas				Vias aéreas cartilaginosas				
		ECA2		TMPRSS2		ECA2		TMPRSS2		
		Mediana	IQR (25 – 75)	Mediana	IQR (25 – 75)	Mediana	IQR (25 – 75)	Mediana	IQR (25 – 75)	
Sem sepse	17	0.017	(0.010 – 0.036)	5.057	(2.174 – 7.934)	15	0.022	(0.015 – 0.064)	7.781	(3.341 – 14.546)
Com sepse	11	0.058	(0.008 – 0.154)	2.013	(1.541 – 9.101)	9	0.061	(0.036 – 0.130)	2.092	(0.644 – 9.905)

Os resultados são apresentados em mediana (IQR). As proteínas são apresentadas como uma área positiva pelo comprimento do septo ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). **ECA2**, enzima conversora de angiotensina 2; **TMPRSS2**, serina protease transmembrana 2.

Tabela A3 – Análise descritiva da expressão de ECA2 e TMPRSS2 nas vias aéreas de crianças sem sepse, adultos e idosos.

	N	Vias aéreas não cartilaginosas				Vias aéreas cartilaginosas				
		ECA2		TMPRSS2		ECA2		TMPRSS2		
		Mediana	IQR (25 – 75)	Mediana	IQR (25 – 75)	Mediana	IQR (25 – 75)	Mediana	IQR (25 – 75)	
Crianças sem sepse	17	0.017	(0.010 – 0.036)	5.057	(2.174 – 7.934)	15	0.022	(0.015 – 0.064)	7.781	(3.341 – 14.546)
Adultos	5	0.005	(0.002 – 0.012)	1.527	(1.200 – 5.043)	1	0.001	(0.001 – 0.001)	4.071	(4.071 – 4.071)
Idosos	4	0.006	(0.002 – 0.013)	2.191	(2.191 – 4.402)	5	0.019	(0.010 – 0.023)	2.801	(0.745 – 3.726)

Os resultados são apresentados em mediana (IQR). As proteínas são apresentadas como uma área positiva pelo comprimento do septo ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). **ECA2**, enzima conversora de angiotensina 2; **TMPRSS2**, serina protease transmembrana 2.

Tabela A4 – Análise descritiva da expressão de ECA2 e TMPRSS2 em ambos os sexos no parênquima pulmonar das faixas etárias das crianças sem sepse.

Parênquima Pulmonar						
Crianças sem sepse	Sexo	N	ECA2		TMPRSS2	
			Mediana	IQR(25 - 75)	Mediana	IQR(25 - 75)
0-1ano	Feminino	3	0.098	(0.016 - 0.176)	1.246	(0.723 - 1.527)
	Masculino	2	0.060	(0.053 - 0.067)	1.940	(0.596 - 3.285)
2-5 anos	Feminino	2	0.036	(0.013 - 0.060)	0.614	(0.136 - 1.091)
	Masculino	4	0.021	(0.015 - 0.085)	0.945	(0.689 - 1.173)
6-10 anos	Feminino	3	0.007	(0.004 - 0.020)	0.623	(0.414 - 1.132)
	Masculino	3	0.032	(0.014 - 0.057)	0.745	(0.606 - 0.902)
11-15 anos	Feminino	3	0.031	(0.002 - 0.190)	1.235	(0.659 - 1.536)
	Masculino	2	0.056	(0.035 - 0.076)	0.492	(0.301 - 0.682)
16-19 anos	Feminino	1	0.183	(0.183 - 0.183)	0.237	(0.237 - 0.237)
	Masculino	3	0.009	(0.002 - 0.061)	1.200	(0.113 - 1.501)

Os resultados são apresentados em mediana (IQR). As proteínas são apresentadas como uma área positiva pelo comprimento do septo ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). **ECA2**, enzima conversora de angiotensina 2; **TMPRSS2**, serina protease transmembrana 2

Tabela A5 – Análise descritiva da expressão de ECA2 e TMPRSS2 em ambos os sexos nas vias aéreas das faixas etárias das crianças sem sepse.

Vias aéreas	Proteínas	N	Feminino		N	Masculino		p
			Mediana	IQR (25 - 75)		Mediana	IQR (25 - 75)	
Não cartilagosas	ECA2	9	0.010	(0.008 - 0.014)	17	0.017	(0.005 - 0.036)	0.458
	TMPRSS2	9	5.057	(3.795 - 5.778)	17	3.027	(1.527 - 5.463)	0.458
Cartilagosas	ECA2	8	0.021	(0.014 - 0.053)	13	0.019	(0.014 - 0.051)	0.916
	TMPRSS2	8	3.263	(1.734 - 11.940)	12	5.731	(3.709 - 10.110)	0.473

Os resultados são apresentados em mediana (IQR). As proteínas são apresentadas como uma área positiva pelo comprimento do septo ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). **ECA2**, enzima conversora de angiotensina 2; **TMPRSS2**, serina protease transmembrana 2.

Tabela A6 – Análise descritiva das expressões de ECA2 e TMPRSS2 no parênquima pulmonar de adultos e idosos com e sem COVID-19.

Parênquima Pulmonar						
		N	ECA2		TMPRSS2	
			Mediana	IQR (25 - 75)	Mediana	IQR (25 - 75)
Sem COVID-19	Adultos	7	0.012	(0.003 - 0.015)	0.144	(0.120 - 0.274)#
	Idosos	11	0.015	(0.005 - 0.035)	0.331	(0.167 - 0.520)
Com COVID-19	Adultos	14	0.050	(0.017 - 0.090)*	0.641	(0.301 - 0.851)
	Idosos	14	0.065	(0.033 - 0.147)*	0.466	(0.266 - 0.807)

Os resultados são apresentados em mediana (IQR). Os marcadores são apresentados como uma área positiva pelo comprimento do septo ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). **ECA2**, enzima conversora de angiotensina 2; **TMPRSS2**, serina protease transmembrana 2.

ACE2 [*Adultos e idosos com COVID-19 \neq adultos ($p=0,001$; $p=0,001$) e idosos ($p=0,015$; $p=0,004$) sem COVID-19]; TMRSS2 [*Adults sem COVID-19 \neq adultos ($p=0,020$) e idosos ($p=0,046$) com COVID-19].