

La expresión génica de las vías respiratorias superiores en niños muestra una respuesta inmune adaptativa robusta al SARS-CoV-2

Eran Mick^{1,2,3,8}, Alexandra Tsitsiklis^{1,8}, Natasha Spottiswoode¹, Saharai Caldera^{1,3}, Paula Hayakawa Serpa^{1,3}, Angela M. Detweiler³, Norma Neff³, Angela Oliveira Pisco³, Lucy M. Li³, Hanna Retallack⁴, Kalani Ratnasiri³, Kayla M. Williamson⁵, Victoria Soesanto⁵, Eric A. F. Simões⁶, Christiana Smith⁶, Lisa Abuogi⁶, Amy Kistler³, Brandie D. Wagner^{5,6}, Joseph L. DeRisi^{3,4}, Lilliam Ambroggio⁶, Pedro M. Mourani^{6,7,9} y Charles R. Langelier^{1,3,9} 

A diferencia de otros virus respiratorios, el SARS-CoV-2 causa desproporcionadamente una enfermedad grave en los adultos mayores, mientras que la carga de la enfermedad en los niños es menor. Para investigar si las diferencias en la respuesta inmune de las vías respiratorias superiores pueden contribuir a esta disparidad, comparamos la expresión génica nasofaríngea en 83 niños (<19 años de edad; 38 con SARS-CoV-2, 11 con otros virus respiratorios, 34 sin virus) y 154 adultos mayores (>40 años; 45 con SARS-CoV-2, 28 con otros virus respiratorios, 81 sin virus). La expresión de genes estimulados por interferón se activa de manera robusta tanto en niños como en adultos con infección por SARS-CoV-2 en comparación con los respectivos grupos no virales, con solo distinciones sutiles. Los niños, sin embargo, demuestran una regulación al alza marcadamente mayor de las vías relacionadas con la activación de las células B y las células T y la señalización de citoquinas proinflamatorias, incluida la respuesta al TNF y la producción de IFN γ , IL-2 e IL-4. La deconvolución de tipo celular confirma un mayor reclutamiento de células B, y en menor grado de macrófagos, a la vía aérea superior de los niños. Solo los niños exhiben una disminución en las proporciones de células ciliadas, entre los objetivos principales del SARS-CoV-2, tras la infección. Estos hallazgos demuestran que los niños provocan una respuesta inmune innata y especialmente adaptativa más robusta al SARS-CoV-2

¹ División de Enfermedades Infecciosas, Universidad de California, San Francisco, CA, ESTADOS UNIDOS. ² División de Medicina Pulmonar y de Cuidados Críticos, Universidad de California, San Francisco, CA, ESTADOS UNIDOS. ³ Chan Zuckerberg Biohub, San Francisco, CA, Estados Unidos. ⁴ Departamento de Bioquímica y Biofísica, Universidad de California, San

Francisco, CA, Estados Unidos. ⁵ Departamento de Bioestadística e Informática, Escuela de Salud Pública de Colorado, Universidad de Colorado, Aurora, CO, EE. UU. ⁶ Departamento de Pediatría, Universidad de Colorado y Children's Hospital Colorado, Aurora, CO, USA. ⁷ Dirección actual: Arkansas Children's Research Institute, Arkansas Children's Hospital, Little Rock, AR, USA. ⁸ Estos autores contribuyeron igualmente: Eran Mick, Alexandra Tsitsiklis. ⁹ Estos autores supervisaron conjuntamente este trabajo:

Peter M. Mourani, Charles R. Langelier.  Correo electrónico: chaz.langelier@ucsf.edu

en las vías respiratorias superiores que probablemente contribuye a su protección contra enfermedades graves en las vías respiratorias inferiores.

Una de las características distintivas de la pandemia de COVID-19 ha sido la sorprendente relación entre la gravedad de la enfermedad y la edad de 1 a 3 años¹. Si bien la infección con otros virus respiratorios, como influenza o el virus sincitial respiratorio, causan morbilidad y mortalidad significativas tanto en niños pequeños como en adultos mayores de 4 a 9 años, la COVID-19 grave ocurre de manera desproporcionada en adultos mayores^{1-3,10-14}. Un estudio de modelado integral, realizado antes de la llegada de las vacunas, estimó que la tasa de mortalidad por infección era más baja para los niños de 5 a 9 años (~ 0.001%) y que incluso los adultos en sus 40 años ya tenían un riesgo 100 veces mayor de muerte por COVID-19¹. El efecto dependiente de la edad sobre la gravedad de la enfermedad y la mortalidad se ha demostrado incluso cuando se tienen en cuenta las comorbilidades asociadas a la edad¹⁵.

Algunos estudios han examinado las diferencias en los procedimientos inmunológicos sistémicos de niños y adultos con COVID-19. Entre los pacientes en la fase temprana/leve de la infección, los niños y los adultos mostraron una magnitud comparable de respuestas inmunes innatas sistémicas, incluida la expresión génica innata estimulada por interferón y pro-infl¹⁶. Sin embargo, estas respuestas tendían a resolverse más rápidamente en los niños, mientras que los adultos mantenían una respuesta prolongada insitu y citotóxica en la circulación¹⁶⁻¹⁸. Entre los pacientes hospitalizados, los adultos mostraron una mayor amplitud y actividad neutralizante de los anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2, así como respuestas más fuertes de las células T CD4 + a la proteína espiga^{19,20}, lo que sugiere que los resultados más pobres en los adultos no se deben a la falta de una respuesta adaptativa sistémica robusta e incluso pueden ser impulsados por ella.

Trabajos recientes también han comenzado a arrojar luz sobre las diferencias relacionadas con la edad en la respuesta inmune en el sitio de la infección inicial, las vías respiratorias superiores. Se ha propuesto que la vía aérea superior de los niños está preparada para la detección viral, exhibe un estado antiviral preactivado y/o activa una respuesta inmune innata más robusta ante la infección por SARSCoV-2 17,21,22. Sin embargo, numerosos estudios han encontrado poca o ninguna evidencia de una diferencia sistemática entre niños y adultos infectados en la distribución de la carga viral del SARS-CoV-2 en la nasofaringe o en la cinética del aclaramiento viral 16,23-26, y algunos estudios incluso han demostrado que los bebés exhiben la carga viral más alta 27,28. Esto sugiere que los niños no son significativamente más capaces de lograr un control temprano de la replicación viral en las vías respiratorias superiores. Sin embargo, las diferencias en el microambiente de las vías respiratorias superiores y la respuesta inmune podrían contribuir a la protección contra la enfermedad grave en los niños de maneras adicionales, por ejemplo, limitando la migración del virus a las vías respiratorias inferiores.

Varios estudios han puesto especial énfasis en las diferencias potenciales en la expresión de genes estimulados por interferón (ISG) en las vías respiratorias superiores de niños y adultos, dada su importancia bien establecida como primera línea de la inmunidad innata antiviral 17,21,22,29. Sin embargo, estos estudios informaron algunos resultados contradictorios, y ninguno controló directamente la carga viral del SARS-CoV-2 sobre una base de gen por gen, lo que destaca la necesidad de una mayor investigación.

Aquí, evaluamos las diferencias relacionadas con la edad en la expresión génica de las vías respiratorias superiores en respuesta a la infección por SARS-CoV-2 comparando los datos de secuenciación de ARN publicados previamente de hisopos nasofaríngeos (NP) de una cohorte adulta³⁰ con nuevos datos de secuenciación de una cohorte pediátrica. Nuestros resultados sugieren que las diferencias en la magnitud general de la expresión de ISG en las vías respiratorias superiores de niños y adultos con COVID-19 son sutiles y parece poco probable que expliquen sus distintos resultados clínicos. Sin embargo, también hay evidencia de respuestas inmunes innatas y especialmente adaptativas más robustas en las vías respiratorias superiores de los niños, así como un mayor aclaramiento de las células ciliadas, lo que puede contribuir a su protección contra la enfermedad grave.

Resultados

Para comparar la respuesta de la expresión génica de las vías respiratorias superiores a la infección por SARSCoV-2 en niños y adultos, utilizamos un conjunto de datos publicado previamente de secuenciación de ARN de hisopo NP de una cohorte adulta³⁰ junto con hisopos recién secuenciados de una cohorte pediátrica. Todas las muestras se obtuvieron en el curso de las pruebas clínicas para la infección por SARS-CoV-2 en la Universidad de California en San Francisco o en el Hospital Infantil de Colorado entre marzo y septiembre de 2020, antes de la disponibilidad de las vacunas contra el COVID-19. Se incluyeron pacientes de hasta 19 años de edad en la cohorte pediátrica y se restringió la cohorte de adultos a aquellos de al menos 40 años de edad para imponer una separación más clara.

Dividimos cada cohorte de edad en tres grupos de estado viral:

- 1) pacientes con infección por PCR-CoV-2 ("grupo SARSCoV-2"), 2) pacientes negativos para SARS-CoV-2 por PCR sin otro virus respiratorio patógeno detectado por secuenciación de ARN metagenómico (grupo "Sin virus"), y 3) pacientes negativos para SARS-CoV-2 que tenían otro virus respiratorio detectado por secuenciación ("Otro virus" grupo). Finalmente, limitamos las muestras en el grupo de SARS-CoV-2 a aquellas con al menos 10 lecturas virales por millón (rpM), comparables a los valores de PCR Ct por debajo de 30³⁰. La carga viral por encima de este umbral es característica de la infección aguda, desde justo antes del inicio de los síntomas hasta ~ 6 días después³¹, y se ha

asociado con la recuperación del virus que se replica activamente³²⁻³⁴.

El conjunto de datos finales incluyó a 83 niños (38 SARS-CoV-2, 34 sin virus, 11 otros virus; mediana de edad de 4 años, IQR 2-12) y 154 adultos (45 SARS-CoV-2, 81 sin virus, 28 otros virus; mediana de edad de 62 años, IQR 47-71) (Fig. 1a, b; Cuadro 1; Datos complementarios 1). La mayoría de los pacientes en el grupo de SARS-CoV-2 en ambas cohortes de edad fueron evaluados como pacientes ambulatorios, indicativos de una etapa temprana / leve de la enfermedad (Tabla 1). Las muestras en el grupo de SARS-CoV-2 en ambas cohortes de edad abarcaron varios órdenes de magnitud de carga viral, y aunque la carga viral tendió a aumentar en los niños, esta no alcanzó el signo estadístico (Fig. 1c). Los pacientes en el grupo Sin Virus en ambas cohortes de edad tuvieron más probabilidades de ser hospitalizados, con una mayor proporción en la cohorte pediátrica (Tabla 1; Datos complementarios 1). El rinovirus fue el más prevalente entre los otros virus respiratorios en ambas cohortes de edad (Fig. 1d).

Comenzamos realizando análisis de expresión diferencial (DE) entre los grupos SARS-CoV-2 y No Virus dentro de cada cohorte de edad por separado. Este enfoque minimiza la confusión por diferencias de edad no relacionadas con la infección por SARS-CoV-2 y por cualquier posible efecto por lotes, aunque podría estar endesacuerdo con las diferencias entre el grupo Sin virus de cada cohorte. Los análisis arrojaron 1.961 y 1.216 genes expresados diferencialmente a un valor $p < 0,1$ (basado en un estadístico t moderado y ajustado por Benjamini-Hochberg) para las cohortes pediátrica y adulta, respectivamente (Datos complementarios 2). Como era de esperar, los genes estimulados por interferón (ISG) fueron prominentes entre los genes altamente significativos en ambas cohortes de edad (Fig. 1a suplementaria). En general, los niños exhibieron un número considerablemente mayor de genes DE únicos, incluidos los genes inmunovinculados, a pesar de un tamaño de muestra más pequeño que se habría esperado que proporcionara menos poder estadístico (Fig. 1a suplementaria).

A continuación, realizamos análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes³⁵ (GSEA) utilizando anotaciones de procesos biológicos³⁶ de Gene Ontology (GO) en los resultados de DE de cada cohorte y comparamos las vías enriquecidas. Como era de esperar, una variedad de vías relacionadas con el sistema inmunitario se regularon al alza tanto en adultos como en niños con infección por SARS-CoV-2 en comparación con aquellos sin virus (Fig. 2bis; Fig. 1b suplementaria; Datos complementarios 3). Las vías relacionadas con la respuesta al interferón parecían en su conjunto ser fuertemente inducidas tanto en niños como en adultos. Los niños, sin embargo, demostraron una regulación ascendente más fuerte de las vías para la activación de las células B, la activación de las células T, la respuesta al TNF, la activación de los macrófagos y la fagocitosis. Los niños también exhibieron una activación más fuerte de varias vías de producción de citoquinas típicamente asociadas con la activación de células T, como IL-2, IL-4 e IFN γ producción (Fig. 2a-c suplementaria). Algunas vías mostraron cambios en la expresión

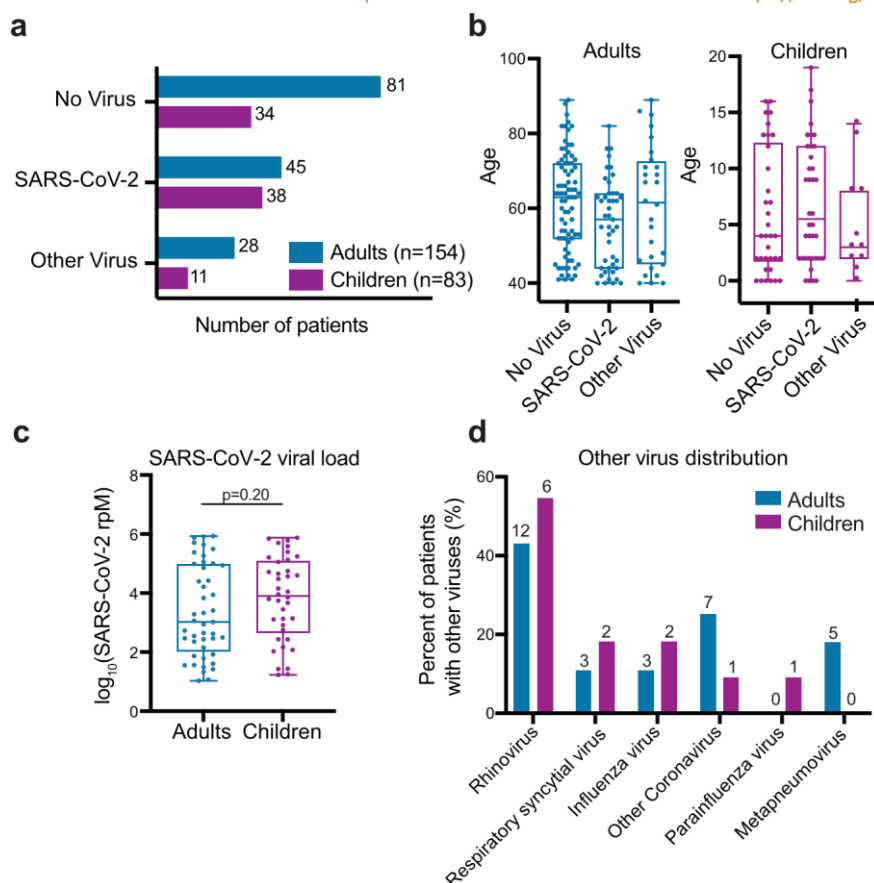


Fig. 1 Número de pacientes, distribución por edades, carga viral del SARS-CoV-2 y otros virus presentes en las cohortes adulta y pediátrica. **a** Número de pacientes en los grupos SARS-CoV-2, Sin virus y Otros virus en las cohortes de adultos y pediátricos. El color indica la cohorte de edad. **b** Distribución por edades en los tres grupos de estado viral en las cohortes de adultos y pediátricos. Las líneas horizontales denotan la mediana, los límites de la caja representan el rango intercuartílico, y los bigotes se extienden al mínimo y al máximo. Adultos-Sin Virus $n=81$, Adultos-SARS-CoV-2 $n=45$, Adultos-Otro Virus $n=28$, Niños-Sin Virus $n=34$, Niños-SARS-CoV-2 $n=38$, Niños-Otro Virus $n=11$. **c** Distribución de la carga viral del SARS-CoV-2, medida en lecturas por millón (rpM), en pacientes adultos ($n=45$) y pediátricos ($n=38$). Las líneas horizontales denotan la mediana, los límites de la caja representan el rango intercuartílico, y los bigotes se extienden al mínimo y al máximo. El valor P se deriva de una prueba de Mann-Whitney de dos caras. **d** Distribución de los virus en los grupos de Otros Virus en las cohortes adulta y pediátrica. Los números absolutos se proporcionan sobre cada barra, el eje y indica el porcentaje del grupo Otro virus de cada cohorte. Un niño estaba infectado con influenza y rinovirus y dos adultos estaban infectados con el virus sincial respiratorio y el rinovirus.

en direcciones opuestas en comparación con el respectivo grupo Sin virus, como la inmunidad mediada por neutrófilos y la inmunidad mediada por mastocitos. Tanto los niños como los adultos infectados con SARS-CoV-2 exhibieron una regulación a la baja de la expresión génica del receptor olfativo ('percepción sensorial del estímulo químico'), consistente con la pérdida del sentido del olfato que se ha observado clínicamente en todo el espectro de edad^{37,38}.

Complementamos los análisis que compararon pacientes con SARS-CoV-2 y Sin Virus en cada cohorte por separado comparando directamente la expresión génica entre niños y adultos infectados por SARS-CoV-2, controlando la carga viral. Identificamos 5.352 genes expresados diferencialmente a un valor $p < 0,1$ (basado en un estadístico moderado y ajustado por Benjamini-Hochberg; Datos complementarios 4). Las diferencias de edad no relacionadas con el estado viral probablemente contribuyeron al mayor número de genes DE en la comparación directa. Sin embargo, GSEA de los resultados de DE arrojó patrones generales similares a los descritos anteriormente con respecto a las vías inmunes (Fig. 2b; Datos complementarios 5). Las vías relacionadas con las células B (activación de las células B,

respuesta inmune humoral), las vías relacionadas con las células T (activación de las células T, IL-2, IL-4 e IFN γ producción) y la señalización de quimiocinas / citoquinas se expresaron más altamente en niños con infección por SARS-CoV-2.

Si bien algunas vías inmunitarias no alcanzaron signos estadísticos en la comparación directa entre niños y adultos con infección por SARS-CoV-2, generalmente tendieron en la misma dirección observada en la comparación con los grupos Sin Virus (Fig. 2a, b). Por otro lado, la marcada disparidad en la activación de neutrófilos observada en la comparación con los grupos sin virus solo se apoyó débilmente en la comparación directa, probablemente refluendo diferencias entre los propios pacientes sin virus. La comparación directa reveló claramente una menor expresión de genes ciliados en niños con infección por SARS-CoV-2 y sugirió una tendencia hacia una menor expresión de genes estimulados por interferón (Fig. 2b; Fig. 2d suplementaria), aunque la vía simplemente no alcanzó el límite estadístico de significancia (p -valor = 0,06, basado en un enfoque adaptativo de división multinivel de Monte Carlo y Benjamini-Hochberg ajustado). Como era de esperar, muchos procesos de desarrollo no relacionados con la infección también

difirieron en la comparación directa entre niños y adultos (Datos complementarios 5).

Es importante destacar que observamos resultados similares de DE y GSEA en un análisis secundario restringido solo a niños

ambulatorios ($n = 30$) y adultos ($n = 24$) con infección por SARS-CoV-2, lo que sugiere que las diferencias en la proporción de pacientes hospitalizados y

Tabla1AdultandPediatriccohortcharacteristics.									
AdultoCohort					PediátricoCohortAdultvsPediatric				
CohorteInformaciónInformalARS-CoV-2OtherVirusNoVirus					Cohorte SARS-CoV-2OtherVirusNoVirus				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En					En				
p-valor					p-valor				
SARS-CoV-2					SARS-CoV-2				
p-valor					p-valor				
En									

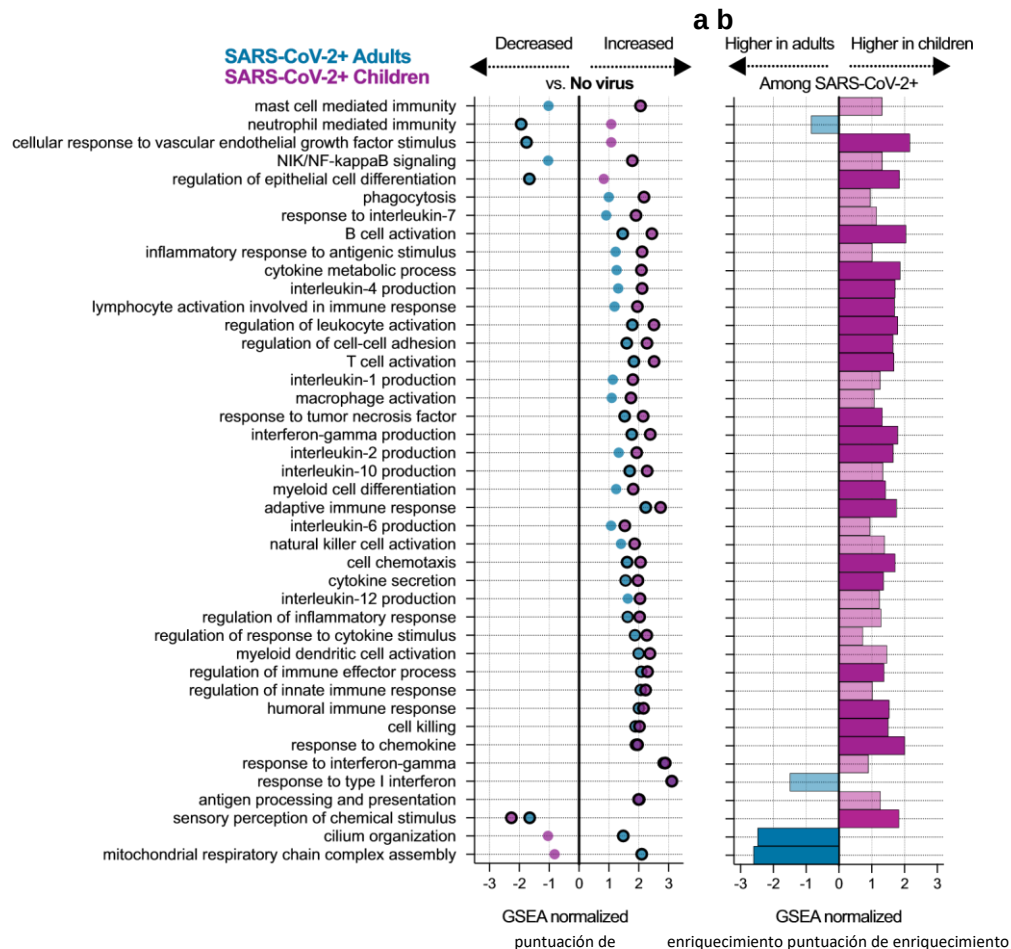


Fig. 2 Vías activadas en niños y adultos tras la infección por SARS-CoV-2. a Puntuaciones de enriquecimiento normalizado de términos seleccionados del proceso biológico GO que alcanzaron significación estadística (valor p ajustado $< 0,05$) en el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) utilizando genes expresados diferencialmente (DE) entre los grupos SARS-CoV-2 y Sin virus en la cohorte adulta o pediátrica. El color indica la cohorte de edad. Los valores p de la vía se calcularon utilizando un enfoque adaptativo de Monte Carlo de división multinivel y se ajustaron Benjamini-Hochberg, y la significación estadística se denota mediante un contorno negro alrededor del círculo. Los resultados completos se proporcionan en los datos complementarios 3. b Puntuaciones de enriquecimiento normalizado para los mismos términos de GO que en (a) en el GSEA utilizando genes DE entre niños y adultos con infección por SARS-CoV-2. Las barras de color oscuro representan vías que alcanzaron significación estadística (ajustadas)

valor $p < 0,05$). Los resultados completos se proporcionan en los datos complementarios 5.

los pacientes ambulatorios de cada cohorte no sesgaron la comparación directa (Fig. 3 suplementaria).

Muchas de las vías identificadas en los resultados de GSEA expresadas diferencialmente entre niños y adultos con infección por SARS-CoV-2 estaban estrechamente relacionadas con los tipos de células específicas. Por lo tanto, aplicamos in silico la estimación de las proporciones de tipo celular³⁹ basada en genes marcadores derivados de un estudio unicelular de la vía aérea⁴⁰ como un enfoque adicional para contextualizar nuestras finanzas (Fig. 3; Figura complementaria 4; Datos complementarios 6). De acuerdo con los resultados de GSEA, encontramos que la infección por SARS-CoV-2 desencadenó un reclutamiento significativamente mayor de células B en las vías respiratorias superiores en niños en comparación con adultos, lo que también fue evidente en la comparación entre niños y adultos con otros virus respiratorios (Fig. 3a). Por el contrario, las diferencias en las proporciones estimadas de células T fueron mucho más sutiles

(Fig. 4a suplementaria), lo que sugiere que los resultados de GSEA pueden cambiarlas distinciones en la identidad y regulación de las células T y no solo en el número de células.

En el análisis previo de la cohorte adulta, la infección por SARS-CoV-2 se asoció con un reclutamiento embotado de macrófagos y neutrófilos en las vías respiratorias superiores en comparación con otras infecciones virales respiratorias³⁰. El grupo pediátrico de Otros Virus fue demasiado pequeño para concluir definitivamente si esta observación recapitula en niños, especialmente dada la mezcla de diferentes virus representados. Sin embargo, es notable que una fracción sustancial de las muestras en el grupo pediátrico de Otros Virus exhibieron proporciones marcadamente más altas de macrófagos, neutrófilos y células dendríticas que la mayoría de las muestras de SARS-CoV-2 (Fig. 3b–d). Las proporciones de macrófagos tendieron a aumentar en los niños con infección por SARS-CoV-2 en comparación con los adultos (Fig. 3b).

Curiosamente, mientras que las proporciones de células ciliadas no difirieron entre niños y adultos en los grupos sin virus, los niños con infección por SARS-CoV-2 mostraron una marcada

disminución en las proporciones de células ciliadas que estuvo ausente en los adultos (Fig. 3e), consistente con los resultados de GSEA. Esto se acompañó de mayores proporciones de células basales en niños en comparación con adultos con infección por SARS-CoV-2 (Fig. 3f), posiblemente regeneración compensatoria del epitelio de las vías respiratorias.

Finalmente, se deseaba examinar el efecto de la carga viral del SARS-CoV-2 sobre la expresión génica en vías de interés dentro de cada cohorte de edad. La expresión de genes estimulados por interferón (ISG) se correlaciona con frecuencia con la carga viral, como se observó previamente en la cohorte adulta³⁰. Se realizó una regresión robusta para relacionar la expresión de $n = 100$ ISG

considerablemente mejor con la carga viral en niños, más sorprendentemente ejemplificado por genes como IFI6 e IFI27 (Fig. 4d). Mientras que incluso los adultos con baja carga viral mostraron una expresión elevada de estos genes, la respuesta en los niños fue más gradual y solo alcanzó a los adultos con cargas virales más altas. Los ISG que cambiaron de una respuesta casi gradual al virus en adultos a una más proporcional en niños se encontraban entre los genes de vanguardia que contribuyeron a la tendencia aparente hacia una menor expresión de la vía de respuesta al interferón en niños en los resultados de GSEA (Fig. 2b; Fig. 2d suplementaria; Datos complementarios 5). Estas cifras sugieren diferencias relativamente sutiles en la regulación de las

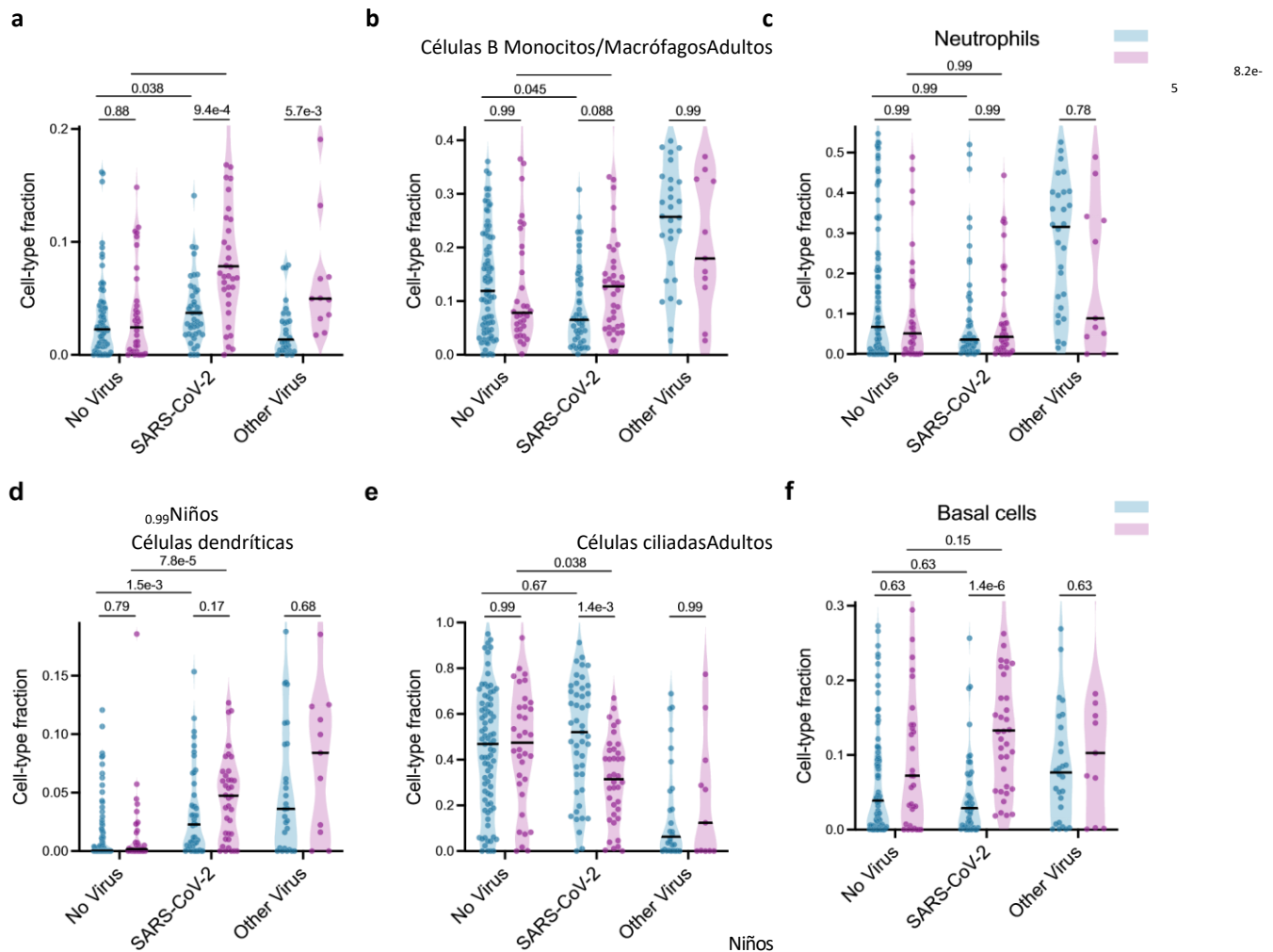


Fig. 3 Diferencias de proporción de tipo celular entre niños y adultos. a–f Estimación in silico de proporciones de tipo celular en la secuenciación masiva de ARN utilizando firmas unicelulares. El color indica la cohorte de edad. Las líneas negras denotan la mediana. El eje y en cada panel se recortó al valor máximo entre todos los grupos de $1.5 \times \text{IQR}$ por encima del tercer cuartil, donde IQR es el rango intercuartílico. Para cada tipo de célula, comparamos formalmente cada grupo de estado viral entre las dos cohortes de edad, así como los grupos Sin Virus y SARS-CoV-2 dentro de cada cohorte de edad. Las comparaciones por pares se realizaron con una prueba de Mann-Whitney de dos caras seguida de la corrección de Holm para pruebas múltiples. Adultos-Sin Virus $n = 81$, Adultos-SARS-CoV-2 $n = 45$, Adultos-Otro Virus $n = 28$, Niños-Sin Virus $n = 34$, Niños-SARS-CoV-2 $n = 38$, Niños-Otro Virus $n = 11$. Los resultados completos se proporcionan en los datos complementarios 6.

con la carga viral en niños o adultos con infección por SARS-CoV-2, y se compararon las pendientes y los coeficientes de determinación resultantes (Fig. 4a, b). Los ISG que se correlacionaron más fuertemente con la carga viral en adultos, como CXCL11 y OASL, exhibieron patrones generales similares en niños con pendientes ligeramente mayores (Fig. 4a–c). Sin embargo, un subconjunto de ISG se correlacionó

especificaciones ISGy/o en los orígenes celulares entre niños y adultos que desafían la generalización simple. Tales diferencias reglamentarias también podrían reflejarse en la expresión diferencial de determinados factores reguladores del interferón (por ejemplo, IRF8; Fig. 2c) suplementaria

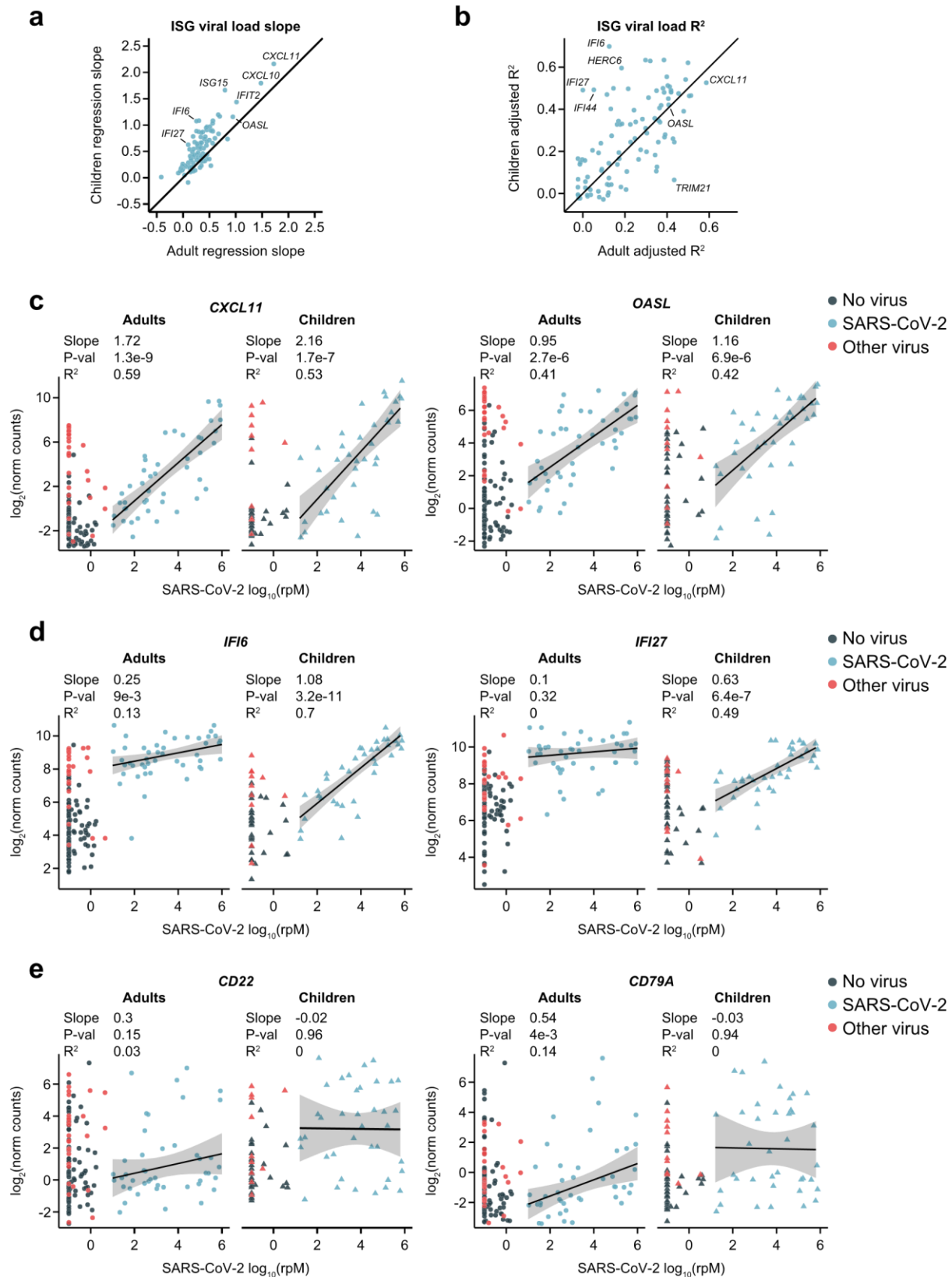
En marcado contraste con los ISG, la expresión de los genes marcadores de células B, como CD22 y CD79A, no estaba

completamente correlacionada con la carga viral en niños (Fig. 4d). Estos genes mostraron una heterogeneidad significativa entre los pacientes, probablemente en relación con el momento de la activación de la respuesta de las células B, pero la fracción de niños que estaban participando en la respuesta en el momento del muestreo fue sustancialmente mayor.

Discusión

Comparamos la expresión génica de las vías respiratorias superiores en niños y adultos para identificar puntos en común y distinciones en la respuesta al SARS-CoV-2 en el sitio de la infección inicial, lo que en última instancia puede contribuir a sus resultados clínicos dispares.

Nuestro análisis apoya la conclusión de que, al controlar la carga viral, los niños y adultos con infección por SARS-CoV-2 participan en una respuesta pronunciada del gen estimulado por interferón (ISG) en la vía aérea superior que, en su conjunto, es de magnitud comparable. Nuestros datos demuestran además que los niños exhiben una "respuesta de dosis" más gradual y proporcional a la carga viral para un subconjunto de ISG prominentes. Estos resultados están ampliamente en línea con los resultados de Koch et al., que también realizaron la secuenciación masiva de ARN en muestras de las vías respiratorias superiores de niños y adultos y evaluaron una medida compuesta de la expresión de ISG en pacientes con la mayor carga viral²⁹. Yoshida et al., que realizaron un estudio de RNAsequencing unicelular, también observaron solo distinciones sutiles, con una regulación ascendente ligeramente más fuerte de la expresión de ISG compuesto en células epiteliales de adultos infectados, pero una regulación ascendente ligeramente más fuerte en las células inmunes de niños infectados¹⁷. En contraste, el análisis de una sola célula de Loske et al. mostró una expresión de ISG algo elevada en niños, aunque ninguno de los estudios de una sola célula controló directamente la carga viral²¹.



Es importante destacar que ambos estudios unicelulares sugirieron un estado antiviral preactivado en niños sanos, caracterizado por una expresión elevada de los receptores de reconocimiento de patrones virales aguas arriba y/o los propios ISG^{17,21}. Nuestro estudio no fue adecuado para examinar esta pregunta ya que los pacientes en los grupos sin virus

generalmente no eran controles sanos. De hecho, puede darse el caso de que un migrar a las vías respiratorias inferiores, donde puede causar una enfermedad más grave

Fig. 4 Relación de la carga viral del SARS-CoV-2 con la expresión génica de ISG y marcadores de células B en niños y adultos. a Diagrama de dispersión de las pendientes de la regresión robusta de la expresión de 100 genes estimulados por interferón (ISG) contra la carga viral en adultos (n= 45; eje x) y niños (n= 38; eje y) con infección por SARS-CoV-2. b Diagrama de dispersión de los coeficientes ajustados de determinación (R^2) a partir de una regresión robusta de la expresión de 100 ISG contra la carga viral en adultos (n= 45; eje x) y niños (n= 38; eje y). c Gráficos de dispersión de recuentos de genes normalizados (escala $\log_2$, eje y) en función de la carga viral del SARS-CoV-2 ($\log_{10}$ (rpM), eje x) en cada cohorte de edad para genes canónicos de respuesta al interferón tipo I que muestran una alta correlación con la carga viral en adultos y niños. El grupo de estado viral se indica por el color del punto. Se realizó una regresión robusta en pacientes con SARS-CoV-2 para caracterizar la relación con la carga viral en cada cohorte de edad (n = 45 adultos, n = 38 niños). Las bandas sombreadas representan intervalos de confianza del 95% alrededor del valor medio previsto. Los resultados numéricos enumerados para cada gen se refieren, de arriba a abajo: la pendiente de regresión, el valor p nominal para la diferencia de la pendiente de 0 (derivado de un estadístico t) y el coeficiente robusto ajustado de determinación (R^2). d Gráficos como en c, para los ISG que muestran una respuesta más gradual a la carga viral en niños. e Parcelas como en c, para B genes marcadores celulares.

el estado antiviral preactivado disminuye la posibilidad de que se establezca una infección productiva en los niños. Sin embargo, numerosos estudios a gran escala han demostrado que los niños infectados no exhiben sistemáticamente una carga viral más baja del SARS-CoV-2 en las vías respiratorias superiores en comparación con los adultos 16,23-26, y la expresión de ISG después de la infección no parece significativamente más fuerte en los niños cuando se controla la carga viral. Por lo tanto, no está claro hasta qué punto un estado antiviral preactivado contribuye en última instancia a resultados clínicos dispares entre niños y adultos que se infectan.

Aparte de esto, nuestros resultados sugieren que elementos importantes de la respuesta inmune adaptativa pueden participar de manera más robusta en las vías respiratorias superiores de los niños. Específicamente, observamos marcadores elevados de expresión génica de la activación de células B y células T, así como la producción de citoquinas típicamente asociada con la activación de células T (como IFN γ), en la vía aérea superior de los niños. Curiosamente, Loske et al. también observaron una mayor prevalencia y activación de las células T, así como la expresión de IFN γ en las vías respiratorias superiores de los niños en su estudio unicelular²¹. Vono et al. informaron recientemente que los niños exhibieron una firma de expresión génica elevada de activación de células B en la circulación en comparación con los adultos en los primeros días después del inicio de los síntomas¹⁶, y Yoshida et al. observaron un aumento sorprendente en los linfocitos ingenuos en la circulación de niños con COVID-19¹⁷, que especularon que podría involucrar a fl ect aumento de la migración de células B y células T al sitio de la infección. Tanto nuestros datos como los de Loske et al. proporcionan evidencia convincente en apoyo de esta hipótesis. Por lo tanto, una respuesta inmune adaptativa temprana a un nuevo patógeno en las vías respiratorias superiores de los niños, tal vez debido a un estado inmunológico más ingenuo, puede representar un factor crítico en la prevención de la progresión a enfermedad grave en los niños.

Finalmente, observamos evidencia consistente con un mayor aclaramiento de células ciliadas en niños con infección por SARS-CoV-2 y un aumento proporcional en las células basales, lo que podría ser diferenciador para restaurar la homeostasis en el epitelio de las vías respiratorias. Estudios recientes han encontrado que las células ciliadas son un objetivo importante para el SARSCoV-2 al inicio de la infección^{41,42}. Por lo tanto, es concebible que un recambio más efectivo de las células ciliadas infectadas y la regeneración epitelial en las vías respiratorias superiores de los niños puedan limitar la capacidad del virus para.

Nuestro estudio tiene varias limitaciones que deben tenerse en cuenta: 1) un tamaño de muestra más grande habría aumentado la generalización de los efectos; 2) no se disponía de información precisa sobre el momento de la recolección de la muestra con respecto al inicio de los síntomas, aunque limitamos nuestro análisis a muestras con carga viral característica del período de tiempo desde justo antes del inicio de los síntomas y hasta ~ 6 días después³¹; 3) no tuvimos acceso a datos secuenciales para investigar la dinámica de la respuesta inmune a lo largo del tiempo; 4) no evaluamos directamente los tipos de células presentes en la mucosa; y por último, 5) la mayoría de los sujetos con COVID-19 tenían enfermedad leve en el momento del muestreo y no requirieron hospitalización. Los resultados pueden haber diferido si se dispusiera de especímenes de una mayor proporción de individuos gravemente enfermos. Sin embargo, esto probablemente resultó en una comparación más relevante ya que relativamente pocos niños desarrollan enfermedad grave y la vía aérea superior ya no es el sitio principal de la patología en la enfermedad grave.

Nuestro estudio proporciona una perspectiva adicional sobre varias hipótesis principales con respecto a los fundamentos moleculares de las disparidades de resultados clínicos entre niños y adultos con COVID-19. Sin embargo, se justifica un estudio adicional para comprender por qué los niños están protegidos contra la enfermedad grave del SARS-CoV-2, o β -coronavirus en general⁴³, en comparación con varios otros patógenos virales respiratorios.

Métodos

Diseño del estudio y cohorte clínica. La cohorte de adultos publicada anteriormente consistió en pacientes con enfermedades respiratorias agudas probados para COVID-19 por RT-PCR en la Universidad de California en San Francisco (UCSF), aprovechando el ARN sobrante extraído de muestras clínicas de hisopo NP³⁰. La Junta de Revisión Institucional de la UCSF otorgó una exención de consentimiento bajo el protocolo # 17-24056. Para los nuevos análisis presentados aquí, aprovechamos este conjunto de datos publicado para adultos mientras lo complementábamos con muestras pediátricas obtenidas de manera similar en UCSF bajo el mismo protocolo. Además, se obtuvieron muestras pediátricas de pacientes analizados para COVID-19 por RT-PCR a partir de hisopos NP en el Children's Hospital Colorado (CHCO). Las muestras y los datos de CHCO se obtuvieron bajo los protocolos de la Junta de Revisión Institucional Múltiple de Colorado # 20-0865, # 20-1617 y # 20-0972, que también otorgaron una exención de consentimiento. Todas las muestras se recogieron entre marzo y septiembre de 2020, antes de la disponibilidad de las vacunas contra la COVID-19. Los datos demográficos y clínicos de todos los pacientes se obtuvieron a partir de una combinación de abstracción electrónica y manual de las historias clínicas en las instituciones respectivas. Los metadatos de muestra completos, incluidos los diagnósticos clínicos conocidos, están disponibles en Datos complementarios 1.

Los niños de hasta 19 años de edad y los adultos de al menos 40 años de edad fueron elegibles para su inclusión en el presente análisis. Algunas muestras se excluyeron en última instancia en función de las métricas de secuenciación, como se describe en las siguientes secciones.

Procesamiento de muestras. El exceso de muestras de hisopo clínico se almacenó en medios de transporte viral a -80 °C en los respectivos Laboratorios de Microbiología Clínica. Los especímenes se descongelaron y se agregaron 200 µL de alícuotas de especímenes a 200 µL de DNA/RNA Shield (Zymo Research, Irvine, CA) en microtubos estériles de 1,5 ml con las precauciones adecuadas de riesgo biológico.

Secuenciación de ARN metagenómico. Los especímenes se sometieron a extracción de ARN y secuenciación metagenómica, como se describió anteriormente³⁰. Briefly, el ARN se extrajo de 200 µL de la muestra en el escudo de ADN / ARN utilizando lisis basada en cuentas y el kit Zymo Pathogen Magbead (Zymo). También procesamos muestras de control negativas (agua y ARN de células HeLa) para tener en cuenta la contaminación de fondo. Todas las muestras fueron aumentadas con estándares de ARN del Consorcio de Controles Externos de ARN (ERCC)⁴⁴. Las muestras fueron tratadas con DNasa, agotadas de ARNr citosólico y mitocondrial utilizando FastSelect (Qiagen, Germantown, MD), y transcritas inversamente para generar ADNc. Las bibliotecas de secuenciación se construyeron utilizando el NEBNext Ultra II Library Prep Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA). Las bibliotecas se sometieron a 146 secuenciaciones de extremo pareado de nucleótidos en un instrumento Illumina Novaseq 6000.

Análisis metagenómico de virus respiratorios. Las muestras se procesaron a través de la tubería CZ-ID (anteriormente llamada IDSeq)^{45,46}, que realiza una alineación basada en referencias tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos contra secuencias en las bases de datos de nucleótidos (NT) y no redundantes (NR) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), respectivamente, seguidas del ensamblaje de las lecturas que coinciden con cada taxón. Además, procesamos los resultados para los virus con patogenicidad establecida en el tracto respiratorio⁴⁷. Evaluamos si uno de estos virus estaba presente en una muestra de pacientes si cumplía con los siguientes tres criterios iniciales: (i) al menos 10 recuentos asignados a secuencias NT, (ii) al menos 1 recuento asignado a secuencias NR, (iii) longitud promedio de alineación de nucleótidos de ensamblaje de al menos 70 pb.

Las muestras de control negativo (agua y ARN de células HeLa) permitieron estimar el número de lecturas de fondo esperadas para cada virus, que se normalizaron por la masa de entrada según lo determinado por la relación entre las lecturas de muestra y los estándares de ARN ERCC de pico. Los virus que cumplían los criterios iniciales descritos anteriormente se probaron adicionalmente para determinar si el número de lecturas de secuenciación alineadas con ellos en la base de datos NT eran significativamente mayor que el fondo. Esto se hizo modelando el número de lecturas de fondo como una distribución binomial negativa, con media y dispersión en los controles negativos. Estimamos el parámetro medio del binomio negativo para cada taxón (virus) promediando los recuentos de lectura en todos los controles negativos después de normalizar mediante recuentos ercc. Se estimó un único parámetro de dispersión en todos los taxones utilizando las funciones `glm.nb()` y `theta.md()` del paquete R MASS. Se consideró que una muestra tenía un virus respiratorio patógeno detectado por secuenciación si el virus alcanzaba un **valor** de **p ajustado** < 0,05 después de la **corrección de Holm** para todas las pruebas realizadas en la misma muestra.

Utilizamos las lecturas virales calculadas por millón (rpM) calculadas por CZ-ID, basadas en la alineación del NT, como una medida uniforme de la abundancia de SARS-CoV-2 en todas las muestras. Se agregó un valor de 0.1 rpM a todas las muestras con rpM < 0.1.

Asignación de muestras a grupos comparadores. Dividimos las muestras en cada cohorte de edad en tres grupos de estado viral: 1) las muestras con una prueba clínica PCR positiva para SARS-CoV-2 se asignaron al **grupo** "SARS-CoV-2"; 2) las muestras con una prueba PCR negativa para SARS-CoV-2 y sin evidencia de otro virus respiratorio patógeno en la secuenciación metagenómica se asignaron al **grupo** "Sin virus"; y 3) muestras con una prueba PCR negativa para SARS-CoV-2 pero otro virus respiratorio detectado por secuenciación fueron asignadas al **grupo** "Otro Virus".

Se conservaron para el análisis solo muestras en los grupos de SARS-CoV-2 con al menos 10 rpM, aproximadamente correspondientes a valores de PCR C_t por debajo de 30³⁰, para centrarnos en casos con probable replicación viral activa, donde se espera encontrar una respuesta transcripcional clara al virus. Este enfoque se basó en la correlación bien establecida entre la carga viral y la

recuperación del virus que se replica activamente a partir de muestras respiratorias, es evidente **que** las muestras con una PCR C_t < 30 se asocian con la capacidad de cultivar SARS-CoV-2³²⁻³⁴. La carga viral por encima de este umbral es típicamente característica de la infección aguda, dentro de ~ 6 días del inicio de los síntomas³¹.

Cuantificación de la expresión génica humana. Después de la demultiplexación, las lecturas de secuenciación se correlacionaron con kallisto⁴⁸ (v. 0.46.1; incluida la corrección de sesgo) a un índice que consiste en todas las transcripciones asociadas con genes codificantes de proteínas humanas (ENSEMBL v.99), secuencias de ARN ribosómico citosólico y mitocondrial, y las secuencias de los estándares de ARN ERCC. Las muestras se conservaron para su análisis si tenían al menos 400,000 recuentos estimados asociados con transcripciones de genes codificantes de proteínas. Los recuentos a nivel genético se generaron a partir de las estimaciones de abundancia a nivel de transcripción utilizando el paquete R tximport⁴⁹, con el método scaledTPM.

Análisis de expresión diferencial (DE). Los genes se conservaron para cada análisis de DE si tenían al menos 10 recuentos en al menos el 20% de las muestras incluidas en el análisis. Todos los análisis se realizaron con el paquete R limma⁵⁰, utilizando normalización cuantil y el método voom. La fórmula de diseño para las comparaciones dentro de cada cohorte de edad fue ~ estado viral, donde el estado viral fue "SARS-CoV-2" o "Sin virus". La fórmula de diseño para la comparación directa entre niños y adultos con infección por SARS-CoV-2 fue ~log₁₀(rpM) + cohorte de edad, donde la cohorte de edad era "niños" o "adultos". Los **valores** p de DE se ajustaron utilizando el método de Benjamini-Hochberg dentro de cada comparación. Los resultados completos de DE están disponibles en Datos suplementarios 2 y Datos complementarios 4.

Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA). El análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes se basó en las anotaciones de la vía del proceso biológico 36 de Gene Ontology (GO), utilizando la versión no redundante disponible a través de WebGestalt⁵¹. Solo se retuvieron vías con un tamaño mínimo de 10 genes y un tamaño máximo de 1500 genes para su análisis. El análisis se realizó utilizando la función `fgseaMultilevel` en el paquete R `fgsea`⁵², que calcula los **valores** p basados en un esquema de Monte Carlo de división adaptativo y multinivel. La entrada consistió en todos los genes en el análisis DE respectivo, excepto los genes de histonas, precalificados por cambio de pliegue. Los conjuntos de genes en la Fig. 2 se seleccionaron manualmente para reducir la redundancia y resaltar diversas vías relacionadas con el sistema inmunitario y otras funciones biológicas relevantes de entre aquellos con un valor p ajustado de Benjamini-Hochberg < 0,05 en al menos una de las tres comparaciones. Los resultados completos se proporcionan en los datos complementarios 3 y 5.

Estimación in silico de proporciones de tipo celular. Las proporciones de tipo celular se estimaron utilizando el algoritmo CIBERSORT X³⁹ basado en firmas de células individuales derivadas del atlas de células pulmonares humanas⁴⁰. Las diferencias en las proporciones estimadas entre los grupos de comparación se evaluaron para el registro estadístico mediante una prueba de Mann-Whitney con la corrección de Holm para pruebas múltiples. Los resultados completos se proporcionan en los datos complementarios 6.

Regresión de los recuentos de genes contra la carga viral. Realizamos una regresión robusta de los recuentos de genes normalizados cuantiles generados por limma (escala log₂) contra log₁₀(rpM) de SARS-CoV-2 para n = 100 ISGs basado en el conjunto de **genes** "Hallmark interferonalpha response" en MSigDB (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb>), así como para genes marcadores de activación de células B seleccionados. El análisis se realizó dentro de cada cohorte de edad por separado utilizando el paquete R `robustbase`⁵³, que implementa estimadores de tipo MM para la regresión lineal^{54,55}, la configuración KS2014 y el modelo: recuentos normalizados cuantiles (escala log 2) ~ log₁₀ (rpM). Las predicciones del modelo se generaron utilizando los efectos del paquete R y se utilizaron para su visualización en las gráficas genéticas individuales. Las bandas de error representan una distribución normal del 95% de los intervalos de confianza alrededor de cada predicción. Los valores p informados para la presencia de la diferencia entre el coeficiente de regresión y el 0 se basan en un estadístico t. Los

valores de R^2 notificados representan el coeficiente robusto ajustado de la determinación⁵⁶.

Resumen de informes. Más información sobre el diseño de la investigación está disponible en el Resumen de informes de investigación de Nature vinculado a este artículo.

Disponibilidad de datos

Los datos de secuenciación en bruto están protegidos debido a las restricciones de privacidad del paciente en los protocolos IRB que rigen la inscripción en este estudio bajo una exención de consentimiento. Los investigadores que deseen obtener el FASTQ files pueden ponerse en contacto con el autor correspondiente para ser agregados a los protocolos IRB y firmar un acuerdo de transferencia de materiales con UCSF que garantice el almacenamiento seguro de los datos y su uso exclusivo para análisis transcriptómicos de identidad. Los recuentos de genes procesados se han depositado bajo la adhesión NCBI GEO [GSE179277](https://doi.org/10.1101/2022.05.11.491511). Los conjuntos de datos de una sola célula de pulmón humano publicados utilizados para el análisis de proporciones de tipo celular se pueden obtener a través de Synapse bajo las accesiones syn21560510 y syn21560511.

El **conjunto** de genes "Hallmark Interferon Alpha Response" está disponible en MsigDB bajo la adhesión M5911. Los datos de origen se proporcionan con este documento.

Disponibilidad de código

El código para el análisis de proporciones de tipo celular y el análisis de regresión robusta está disponible en el repositorio del estudio publicado previamente sobre la cohorte adulta: <https://github.com/czbiohub/covid19-transcriptomics-pathogenesis-diagnostics-results>.

Recibido: 5 de agosto de 2021; Aceptado: 31 de mayo de 2022;

Published online: 08 July 2022

Referencias

- O'Driscoll, M. et al. Age-specific mortality and immunity patterns of SARS-CoV-2. *Naturaleza* 590, 140–145 (2021).
- Levin, A. T. et al. Evaluación de la edad específica de las tasas de mortalidad por INFECCIÓN por COVID-19: revisión sistemática, metanálisis e implicaciones de políticas públicas. *Eur. J. Epidemiol.* 35, 1123–1138 (2020).
- Woolf, S. H., Chapman, D. A. & Lee, J. H. COVID-19 como la principal causa de muerte en los Estados Unidos. *JAMA* <https://doi.org/10.1001/jama.2020.24865> (2020).
- Shi, T. et al. Estimaciones de la carga de morbilidad global, regional y nacional de infecciones agudas de las vías respiratorias inferiores debidas al virus sincitial respiratorio en niños pequeños en 2015: un estudio sistemático de revisión y modelización. *Lancet* 390, 946–958 (2017).
- Nair, H. et al. Carga global de infecciones respiratorias debidas ala inversión **estacional** en niños pequeños: una revisión sistemática y un metanálisis. *Lancet* 378, 1917–1930 (2011).
- Principi, N. & Esposito, S. Grave influenza en niños: Incidencia y factores de riesgo. *Experto Rev. Antiinfeccioso Ther.* 14, 961–968 (2016).
- Matias, G. et al. Estimaciones de hospitalización atribuible a la influenza y RSV en los EE.UU. durante 1997–2009, por edad y estado de riesgo. *BMC Salud Pública* 17, 271 (2017).
- Tin Tin Htar, M., Yerramalla, M. S., Moisi, J. C. & Swerdlow, D. L. The burden of respiratory syncytial virus in adults: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiol. Infecta.* 148, e48 (2020).
- Comité de redacción de la Consulta de la OMS sobre los aspectos clínicos de la pandemia (H1N1) 2009 Influenza. et al. Aspectos clínicos de la pandemia 2009 en la infección por el virus H1N1. *N. Engl. J. Med.* 362, 1708–1719 (2010).
- Ludvigsson, J. F. La revisión sistemática de COVID-19 en niños muestra casos más leves y un mejor pronóstico que los adultos. *Acta. Pediatr.* 109, 1088–1095 (2020).
- Bhopal, S. S., Bagaria, J., Olabi, B. & Bhopal, R. Los niños y jóvenes siguen teniendo un bajo riesgo de mortalidad por COVID-19. *Lancet Niño Adolesc. Salud* 5, e12–e13 (2021).
- Bailey, L. C. et al. Evaluación de 135 794 pacientes pediátricos analizados para detectar el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave en los Estados Unidos. *JAMA Pediatr.* 175, 176 (2021).
- Xu, Y. et al. Características de la infección pediátrica por SARS-CoV-2 y evidencia potencial de diseminación viral fecal persistente. *NAT. Med.* 26, 502–505 (2020).
- Dong, Y. et al. Epidemiología de la COVID-19 entre los niños en China. *Pediatría* 145, <https://doi.org/10.1542/peds.2020-0702> (2020).
- Williamson, E. J. et al. Factores asociados con la muerte relacionada con COVID-19 usando OpenSAFELY. *Naturaleza* 584, 430–436 (2020).
- Vono, M. et al. Las respuestas innatas robustas al SARS-CoV-2 en niños se resuelven más rápido que en adultos sin comprometer la inmunidad adaptativa. *Cell Rep.* 37, 109773 (2021).
- Yoshida, M. et al. Respuestas locales y sistémicas a la infección por SARS-CoV-2 en niños y adultos. *Naturaleza* 1–10 <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04345-x> (2021).
- Cohen, C. A. et al. SARS-CoV-2 specific Las respuestas de las células T son más bajas en los niños y aumentan con la edad y el tiempo después de la infección. *NAT. Comunidad.* 12, 4678 (2021).
- Weisberg, S. P. et al. Distintas respuestas de anticuerpos al SARS-CoV-2 en niños y adultos en todo el espectro clínico de COVID-19. *NAT. Immunol.* 22, 25–31 (2021).
- Pierce, C. A. et al. Respuestas inmunitarias a la infección por SARS-CoV-2 en pacientes pediátricos y adultos hospitalizados. *Sci. Trad. Med.* 12, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd5487> (2020).
- Loske, J. et al. La inmunidad innata antiviral preactivada en las vías respiratorias superiores controla la infección temprana por SARS-CoV-2 en niños. *NAT. Biotechnol.* 1–6 <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01037-9> (2021).
- Pierce, C. A. et al. Barreras mucosas naturales y COVID-19 en niños. *JCI. Insight* 6, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.148694> (2021).
- Madera, S. et al. Las cargas virales nasofaríngeas del SARS-CoV-2 en niños pequeños no difieren significativamente de las de niños mayores y adultos. *Sci. Rep.* 11, 3044 (2021).
- Chung, E. et al. Comparación de los síntomas y los niveles de ARN en niños y adultos con infección por SARS-CoV-2 en el entorno comunitario. *JAMA Pediatrics* <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2021.2025> (2021).
- Bellon, M. et al. Acute Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARSCoV-2) viral load kinetics in symptomatic children, adolescents, and adults. *Clin. Infecta. Dis.* 73, e1384–e1386 (2021).
- Costa, R. et al. Cargas de ARN del SARS-CoV-2 del tracto respiratorio superior en niños y adultos sintomáticos y asintomáticos. *Clin. Microbiol. Infecta.* 27, 1858.e1–1858.e7 (2021).
- Zacarias, P. et al. Los bebés sintomáticos tienen cargas virales nasofaríngeas más altas del SARSCoV-2, pero una enfermedad menos grave que los niños mayores. *Clin. Infecta. Dis.* 71, 2305–2306 (2020).
- Ochoa, V. et al. Los bebés menores de 6 meses infectados con SARS-CoV-2 muestran las cargas virales respiratorias más altas. *J. Infectar. Dis.* 225, 392–395 (2022).
- Koch, C. M. et al. Diferencias relacionadas con la edad en la respuesta inmune de la mucosa nasal al SARS-CoV-2. *Am. J. Respir. Célula Mol. Biol.* <https://doi.org/10.1165/rcmb.2021-0292OC> (2021).
- Mick, E. et al. La expresión génica de las vías respiratorias superiores revela respuestas inmunitarias suprimidas al SARS-CoV-2 en comparación con otros virus respiratorios. *NAT. Comunidad.* 11, 5854 (2020).
- Kissler, S. M. et al. Dinámica viral de las variantes del SARS-CoV-2 en personas vacunadas y no vacunadas. *N. Engl. J. Med.* 385, 2489–2491 (2021).
- Singanayagam, A. et al. Duración de la infecciosidad y correlación con los valores umbral del ciclo RTPCR en casos de COVID-19, Inglaterra, enero a mayo de 2020. *Eurosurveillance* 25, 2001483 (2020).
- La Scola, B. et al. Carga de ARN viral determinada por cultivo celular como herramienta de gestión para el alta de pacientes con SARS-CoV-2 de las salas de enfermedades infecciosas. *Eur. J. Clin. Microbiol Infectar. Dis.* 39, 1059–1061 (2020).
- Yamada, S. et al. Evaluación de la infectividad del SARS-CoV-2 de muestras de las vías respiratorias superiores de pacientes con COVID-19 mediante

- aislamiento del virus mediante células VeroE6/TMPRSS2. *BMJ Open Respir. Res.* 8, e000830 (2021).
35. Subramanian, A. et al. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes: un enfoque basado en el conocimiento para interpretar la expresión de todo el genoma profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. ESTADOS UNIDOS.* 102, 15545–15550 (2005).
 36. Ashburner, M. et al. Ontología génica: Herramienta para la unificación de la biología. *El Consorcio de Ontología Génica. NAT. Jineta.* 25, 25–29 (2000).
 37. Giacomelli, A. et al. Trastornos olfativos y del gusto autoinformados en pacientes con infección respiratoria aguda grave por coronavirus 2: un estudio transversal. *Clin. Infecta. Dis.* 71, 889–890 (2020).
 38. Kumar, L. et al. Pérdida del olfato y el gusto en la infección por COVID-19 en adolescentes. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 142, 110626 (2021).
 39. Newman, A. M. et al. Enumeración robusta de subconjuntos celulares a partir de la expresión tisular **profi les**. *NAT. Métodos* 12, 453–457 (2015).
 40. Travaglini, K. J. et al. Un atlas de células moleculares del pulmón humano a partir de la secuenciación de ARN unicelular. *Naturaleza* 587, 619–625 (2020).
 41. Ravindra, N. G. et al. Análisis longitudinal unicelular de la infección por SARS-CoV-2 en células diana del epitelio identi **es de las** vías respiratorias humanas, alteraciones en la expresión génica y cambios en el estado celular. *PLOS Biol.* 19, e3001143 (2021).
 42. Fiege, J. K. et al. Resolución unicelular del tropismo del SARS-CoV-2, respuestas antivirales y susceptibilidad a las terapias en el epitelio primario de las vías respiratorias humanas. *PLOS Pathog.* 17, e1009292 (2021).
 43. Stockman, L. J. et al. Síndrome respiratorio agudo severo en niños. *Pediatra. Infecta. Dis. J.* 26, 68–74 (2007).
 44. Pine, P. S. et al. Evaluación del material de referencia del Consorcio de Controles Externos de ARN (ERCC) **utilizando un** diseño cuadrado latino modificado. *BMC Biotechnol.* 16, 54 (2016).
 45. Ramesh, A. et al. Secuenciación metagenómica de próxima generación de muestras de enfermedades febriles pediátricas en Tororo, Uganda. *PLoS One* 14, e0218318 (2019).
 46. Kalantar, K. L. et al. IDseq—Un servicio de análisis y canalización de código abierto basado en la nube para la detección y monitoreo de patógenos metagenómicos. *Gigascience* 9, <https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa111> (2020).
 47. Langelier, C. et al. Integración de la respuesta del huésped y la detección imparcial de microbios para el diagnóstico de infecciones del tracto respiratorio inferior en adultos críticamente enfermos. *Proc. Natl. Acad. Sci. ESTADOS UNIDOS.* 115, E12353–E12362 (2018).
 48. Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P. & Pachter, L. Cuantificación **probabilística casi óptima de ARN-seq**. *NAT. Biotechnol.* 34, 525–527 (2016).
 49. Soneson, C., Love, M. I. & Robinson, M. D. Análisis diferenciales para RNA-seq: las estimaciones a nivel de transcripción mejoran las inferencias a nivel de genes. *F1000Res.* 4, 1521 (2015).
 50. Ritchie, M. E. et al. Imma potencia los análisis de expresión diferencial para estudios de RNAsequencing y microarrays. *Ácidos nucleicos Res.* 43, e47 (2015).
 51. Liao, Y., Wang, J., Jaehnic, E. J., Shi, Z. & Zhang, B. WebGestalt 2019: Kit de herramientas de análisis de conjuntos de genes con interfaces de usuario y API renovadas. *Ácidos nucleicos Res.* 47, W199–W205 (2019).
 52. Korotkevich, G. et al. Análisis rápido de enriquecimiento de conjuntos de genes. <https://doi.org/10.1101/060012> de 060012 <https://doi.org/10.1101/060012> bioRxiv (2021).
 53. Maechler, M., Rousseeuw, P., Croux, C., Todorov, V. & Ruckstuhl, A. robustbase: Basic Robust Statistics. Paquete R versión 0.95-0, <http://robustbase.r-forge.r-project.org> (2022).
 54. Koller, M. & Stahel, W. A. Sharpening Wald-type inference in robust regression for small samples. *Estadística computacional. Datos Anales.* 55, 2504–2515 (2011).
 55. Yohai, V. J. Estimaciones robustas de altopunto de desglose **y alta eficiencia** para la regresión. *Ann. Estadísticas.* 15, 642–656 (1987).
 56. Renaud, O. & Victoria-Feser, M.-P. Un sólido coeficiente de determinación para la regresión. *J. Stat. Plan. Inferencia* 140, 1852–1862 (2010).

Agradecimientos

Nos gustaría agradecer a Sam Dominguez, MD, Ph.D. Kirk Harris, Ph.D. Aline Maddux, MD, Christina Osborne, MD, y Matthew Leroue, MD, por su aporte en el diseño del estudio y la revisión de los datos. Agradecemos el apoyo financiero de las siguientes fuentes: NHLBI K23HL138461-01A1 (C.R.L.); Chan Zuckerberg Biohub (C.R.L.); COVID-Child Health Research Award, Instituto de Investigación del Hospital Infantil de Colorado (P.M.M.); y contribuciones filantrópicas de Mark y Carrie Casey, Julia y Kevin Hartz, Carl Kawaja y Wendy Holcombe, Eric Keisman y Linda Nevin, Martin y Leesa Romo, Diana Wagner, Jerry Yang y Akiko Yamazaki, y la Fundación Tres Hermanas (C.R.L.).

Contribuciones de los autores

C.R.L., P.M.M., E.M. y A.T. diseñaron el estudio general con aportes de L.Am., B.D.W., J.L.D. y E.A.F.S. S.C., P.H.S., A.M.D., N.N., A.K., L.Am. y C.R.L. realizaron o supervisaron la adquisición, el procesamiento o la secuenciación de muestras. N.S., L.M.L., H.R., K.R., K.M.W., V.S., B.D.W., L.Am., C.S., L.Ab. y C.R.L. contribuyeron a la intercalación de metadatos de muestra. E.M. y A.T. realizaron todos los análisis y visualización de datos. A.O.P. ayudó con el análisis de proporciones de tipo celular. E.M., A.T. y C.R.L. escribieron el manuscrito con aportes de los coautores.

Intereses contrapuestos

Los autores no declaran intereses contrapuestos.

Información adicional

Información complementaria La versión en línea contiene material complementario disponible en <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31600-0>.

La correspondencia y las solicitudes de materiales deben dirigirse a Charles R. Langelier.

Información de revisión por pares Nature Communications agradece a Matthew Altman y a los otros revisores anónimos por su contribución a la revisión por pares de este trabajo. Los informes de los revisores por pares están disponibles.

Las reimpresiones y la información de permisos están disponibles en <http://www.nature.com/reprints>

Nota del editor Springer Nature se mantiene neutral con respecto a las reclamaciones jurisdiccionales en los mapas publicados y las operaciones institucionales.



Acceso abierto Este artículo está licenciado bajo un Creative Commons

Licencia Internacional de Atribución 4.0, que permite el uso, intercambio, adaptación, distribución y reproducción en cualquier medio o formato, siempre y cuando dé el crédito adecuado al autor o autores originales y a la fuente, proporcione un enlace a la licencia Creative Commons e indique si se realizaron cambios. Las imágenes u otro material de terceros en este artículo se incluyen en la licencia Creative Commons del artículo, a menos que se indique lo contrario en una línea de crédito al material. Si el material no está incluido en la licencia Creative Commons del artículo y su uso previsto no está permitido por la regulación legal o excede el uso permitido, deberá obtener el permiso directamente del titular de los derechos de autor. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© Autor(es) 2022