
natura > rapporti scientifici > articoli > articolo

Articolo | [Accesso libero](#) | [Pubblicato: 03 settembre 2020](#)

Sviluppo di modelli di topo e ratto umanizzati con pelle umana a tutto spessore e cellule immunitarie autologhe

[Yash Agarwal](#) , [Cole Beatty](#) , [Sara Ho](#) , [Lance Thurlow](#) , [Antu Das](#) , [Samantha Kelly](#) , [Isabella Castronova](#) , [Rajeev Salunke](#) , [Shivkumar Biradar](#) , [Tseten Yeshi](#) , [Anthony Richardson](#) e [Moses Bility](#)


[Rapporti scientifici](#) **10** , Numero articolo: 14598 (2020)

5104 Accessi | **23** Altmetric | [Metrica](#)

Astratto

La pelle umana è una barriera significativa per la protezione dalla trasmissione di agenti patogeni. I modelli di roditori utilizzati per indagare su agenti patogeni specifici per l'uomo che prendono di mira la pelle vengono generati introducendo innesti di pelle umana a ceppi di roditori immunocompromessi. L'immunopatogenesi indotta da infezioni è stata studiata separatamente in modelli di roditori umanizzati sviluppati con tessuto linfoide umano e trapianti di cellule staminali ematopoietiche. Il co-innesto riuscito di pelle umana, tessuti linfoidei autologhi e cellule immunitarie autologhe in un modello di roditore non è stato ancora raggiunto, sebbene possa fornire un mezzo per studiare la risposta immunitaria umana alle infezioni nella pelle umana. Qui, presentiamo il topo *NOD* umano della pelle e del sistema immunitario (hSIS) *-humanized IL2R γ null* (NSG) e Sprague-Dawley-Rag2^{tm2hera} Il2r γ ^{tm1hera} (SRG) modelli di ratto, co-innestati con pelle fetale umana a tutto spessore, tessuti linfoidei fetali autologhi e cellule staminali

ematopoietiche fetali autologhe derivate dal fegato. I roditori umanizzati con hSIS dimostrano lo sviluppo della pelle umana a tutto spessore, insieme a tessuti linfoidei autologhi e cellule immunitarie autologhe. Questi modelli supportano anche l'infezione della pelle umana a seguito di inoculazione intradermica con *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina associato alla comunità. Il co-innesto di questi componenti della pelle umana e del sistema immunitario in un unico modello di roditore umanizzato potrebbe fornire una piattaforma per lo studio delle infezioni della pelle umana.

[Download PDF](#)

introduzione

La pelle umana fornisce la prima linea di protezione dell'ospite contro i danni ambientali e la difesa dell'ospite contro i patogeni^{1,2}. Diversi agenti patogeni emergenti, tra cui lo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina associato alla comunità (CA-MRSA), colpiscono la pelle per infezioni e malattie^{1,3,4,5}. Inoltre, le malattie infettive trasmesse da vettori come la malattia di Lyme e la febbre dengue vengono trasmesse tramite inoculazione nella pelle rispettivamente da zecche e zanzare⁶. Le interazioni tra cheratinociti, fibroblasti cutanei e cellule immunitarie cutanee sono coinvolte nell'avvio della risposta immunitaria sistemica e nell'abrogazione della replicazione e della diffusione del patogeno ad altri siti di replicazione^{7,8,9,10}. Pertanto, la pelle fornisce un bersaglio vaccinale ideale per indurre l'immunità contro vari agenti patogeni, come dimostrato dallo sviluppo di diverse nuove tecnologie vaccinali dirette alla pelle, inclusi i vaccini intradermici^{11,12} con cerotti cutanei.

I modelli in vivo per lo studio degli insulti ambientali e dei patogeni che prendono di mira la pelle e le cellule immunitarie cutanee associate coinvolgono principalmente topi e ratti³. Questi modelli di roditori hanno migliorato la comprensione meccanicistica delle malattie umane; tuttavia, esistono differenze significative tra la pelle e il sistema immunitario dell'uomo e dei roditori^{3,13}. La microanatomia della pelle dei roditori differisce dalla microanatomia della pelle umana a causa della mancanza di epidermide multistrato, delle ghiandole eccrine e apocrine e

delle regioni papillare, reticolare e ipo-cutanea dello strato dermico¹⁴. Anche la microanatomia dei tessuti linfoidei primari e secondari umani differisce significativamente da quella dei tessuti linfoidei dei roditori, con differenze significative nel rapporto tra polpa rossa e polpa bianca nella milza e lobulazione del timo^{15, 16, 17}. È noto che il microambiente del tessuto linfoide, comprese le cellule stromali, gioca un ruolo significativo nello sviluppo delle cellule immunitarie¹⁸. Le interazioni tra cellule immunitarie e cellule stromali in tessuti non linfoidei, come la pelle, svolgono un ruolo significativo nel modulare le risposte immunitarie associate ai tessuti¹⁴. Possono formarsi divari traslazionali tra gli studi clinici eseguiti con modelli di roditori tradizionali, evidenziando così la necessità di modelli di roditori umanizzati in grado di supportare l'attecchimento sia della pelle umana che dei componenti del sistema immunitario¹.

Per affrontare il divario tra le specie tra roditori e umani, i ricercatori hanno innestato il modello *murino* immunodeficiente NOD- *scid* IL2R γ ^{null} (NSG), privo di linfociti maturi e cellule natural killer (NK) e possiede difetti nell'immunità innata, con varie cellule e tessuti umani^{19, 20}. Definiti topi NSG umanizzati, questi modelli mostrano sia la ricostituzione delle cellule immunitarie umane che la crescita del tessuto linfoide umano e sono stati utilizzati per ricapitolare le caratteristiche cliniche delle malattie umane (comprese le malattie associate alla pelle)^{21, 22, 23, 24, 25}. Diversi rapporti separati dimostrano che i topi immunodeficienti supportano l'attecchimento della pelle umana^{26, 27}. La pelle umana adulta derivata da rifiuti medici (chirurgia plastica elettiva)^{28, 29} o pelle ingegnerizzata derivata da colture tissutali (cheratinociti e fibroblasti)²⁴ si innesta con successo in topi immunodeficienti. Cellule mononucleate alogene di sangue umano periferico adulto (PBMC) sono state introdotte in questi modelli per imitare le interazioni cellula immunitaria umana-pelle con agenti infettivi^{24, 29}. Sebbene questi modelli murini dimostrino l'attecchimento e lo sviluppo di successo della pelle umana trapiantata e siano suscettibili al trapianto di PBMC allogeniche, dette piattaforme non sono attualmente accoppiate con l'attecchimento di tessuti linfoidei autologhi che sono fondamentali per una risposta immunitaria de novo. I modelli murini umanizzati che combinano la pelle umana, le cellule immunitarie umane e le strutture linfoidee umane devono ancora essere stabiliti, nonostante il loro potenziale per lo sviluppo di un sistema funzionale in vivo, che potrebbe consentire studi sulle interazioni pelle-cellule immunitarie umane³⁰. I modelli murini umanizzati con sistema ematopoietico di origine fetale umana e tessuti linfoidei autologhi sono ben consolidati^{19, 20}. Inoltre, la pelle fetale umana a

tutto spessore si innesta prontamente su topi immunodeficienti e si sviluppa in una pelle di tipo adulto grazie alla sua elevata capacità rigenerativa^{31,32}. Inoltre, la pelle fetale umana mostra bassi livelli di espressione del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) I e II, che si traduce in una ridotta immunogenicità rispetto alla pelle adulta^{31,32}. Pertanto, i tessuti e le cellule di derivazione fetale umana forniscono un mezzo fattibile per sviluppare un modello murino umanizzato con pelle umana autologa e sistema immunitario.

I ratti sono una delle principali specie modello per studi a lungo termine (più di un anno)³³; pertanto, modelli di ratti umanizzati che combinano pelle umana, cellule immunitarie umane e strutture linfoidi umane vengono esplorati per l'uso in studi in vivo a lungo termine sulle interazioni pelle-immunitaria umana. I rapporti hanno dimostrato che i ratti nudi (con immunodeficienza moderata) supportano l'attecchimento e lo sviluppo della pelle umana adulta (pelle a spessore parziale), sebbene il rigetto immunitario mediato dall'ospite si verifichi entro pochi mesi^{34,35,36}. Le prove suggeriscono anche che i ratti nudi supportano l'attecchimento e lo sviluppo del prepuzio neonatale a tutto spessore³⁷. Recentemente, un ratto immunodeficiente, denominato Sprague-Dawley-Rag2^{tm2hera} Il2rγ^{tm1hera} (SRG) rat, è stato sviluppato per supportare l'attecchimento di cellule e tessuti umani in un modello di roditore più grande e di maggiore durata; questo modello manca di cellule T, B e NK mature^{38,39}. Ad oggi, i modelli di ratti umanizzati co-innestati con pelle umana a tutto spessore e tessuti linfoidi autologhi e cellule immunitarie (comprese le cellule immunitarie cutanee) devono ancora essere sviluppati e stabiliti^{28,40,41,42}.

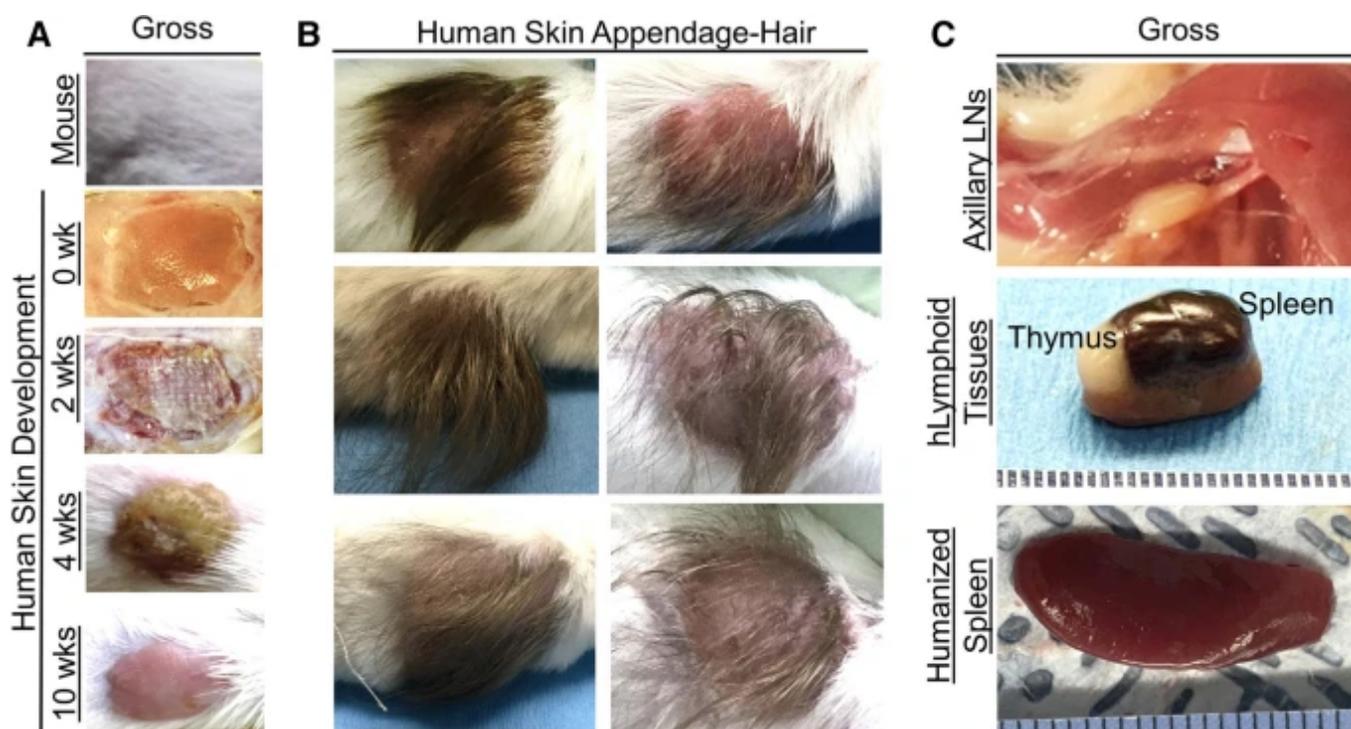
Qui, utilizziamo i modelli di topo NSG immunodeficiente e di ratto SRG per generare modelli di roditori con pelle umana, insieme a tessuto linfoide autologo e cellule immunitarie autologhe, denominati topi NSG e ratti SRG della pelle umana e del sistema immunitario (hSIS). Roditori adolescenti hanno ricevuto co-trapianti di pelle fetale umana a tutto spessore, tessuti linfoidi autologhi e cellule staminali ematopoietiche autologhe. Inoltre, gli xenotrapianti di pelle umana sono stati inoculati con CA-MRSA per stabilire la suscettibilità di questi modelli di roditori umanizzati con hSIS ai patogeni della pelle umana.

Risultati

Il modello murino NSG umanizzato con hSIS supporta lo sviluppo di pelle umana a tutto spessore, tessuti linfoidei autologhi (timo e milza) e cellule immunitarie umane

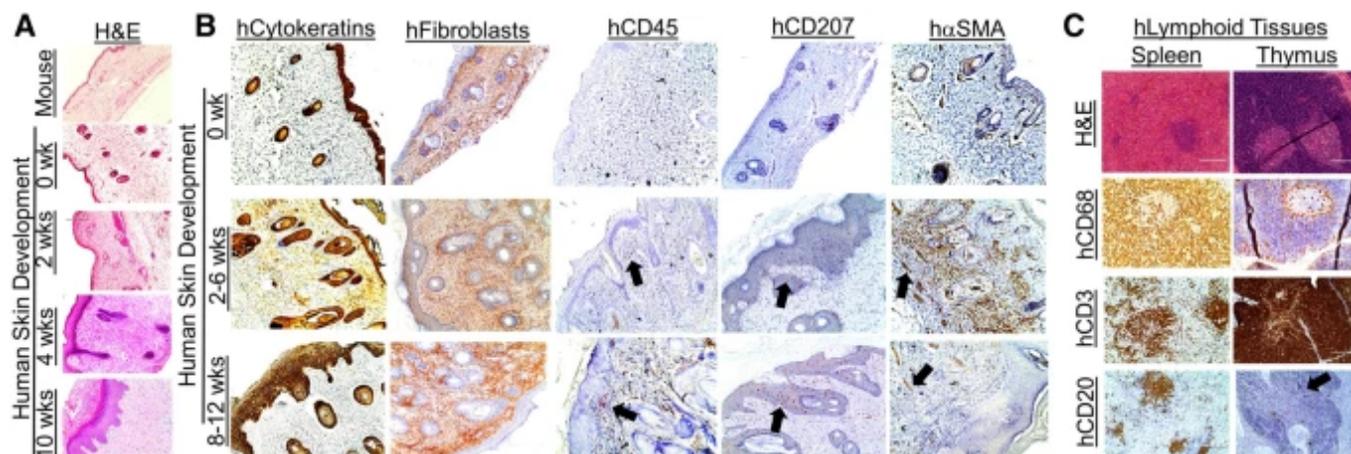
Abbiamo precedentemente dimostrato che i topi NSG supportano lo sviluppo di tessuti linfoidei umani (timo e milza) insieme a cellule immunitarie autologhe dopo l'attecchimento di tessuti fetali e cellule staminali ematopoietiche autologhe¹⁷. Diversi rapporti hanno dimostrato che i topi immunodeficienti supportano lo sviluppo della pelle umana dopo l'attecchimento della pelle fetale umana^{43,44}. Qui, ipotizziamo che i topi NSG supporteranno il co-innesto di pelle fetale umana a tutto spessore, tessuti linfoidei fetali autologhi e cellule staminali ematopoietiche autologhe. Inoltre, ipotizziamo che i topi NSG faciliteranno lo sviluppo della pelle umana e del tessuto linfoide, oltre a consentire la ricostituzione sistemica delle cellule immunitarie umane nei tessuti umani trapiantati e nel sangue. Abbiamo elaborato milza fetale umana, timo e organi epatici in pezzi da ~ 1 mm³ e abbiamo isolato CD34⁺ umano autologocellule staminali ematopoietiche dal fegato fetale, quindi trapiantate i tessuti e le cellule staminali ematopoietiche in topi NSG irradiati. I tessuti della pelle umana sono stati ottenuti dal cuoio capelluto e dal dorso dei donatori e sono stati utilizzati nello sviluppo di innesti di pelle umana con e senza capelli nel modello murino, rispettivamente. La pelle fetale umana a tutto spessore è stata processata attraverso la rimozione dei tessuti adiposi in eccesso attaccati allo strato sottocutaneo della pelle, quindi innestata sopra la gabbia toracica, dove la pelle del topo era stata precedentemente asportata. In tre coorti, il successo complessivo del sistema immunitario umano e dello sviluppo e del mantenimento della pelle autologa a tutto spessore per dieci settimane o più è stato superiore al 75% (Figura complementare 1). Analisi lordo del xenotrapianto pelle umana nel modello HSIS-NSG del mouse a partire dalle due settimane post-trapianto dimostra la guarigione della ferita e la maturazione in adulti come la pelle umana, che è evidente a settimane dieci post-trapianto (Fig. 1 A, supplementare Fig. 2). Una limitazione della pelle umana nel modello murino hSIS-NSG è lo sviluppo di pelle secca (con conseguente indurimento) e i primi segni di perdita di capelli murina (suggestivi di malattia del trapianto contro l'ospite) a 20 settimane dal trapianto (Figura supplementare 2). La pelle umana in topi HSIS-NSG sviluppa anche appendici pelle umana, con capelli umani evidente a 12 settimane post-trapianto (Fig. 1B). Analisi lordo della milza e timo umano xenotrapianti in topi NSG HSIS-umanizzato alle settimane dieci post-trapianto dimostrato la crescita di quei tessuti linfoidei sotto la capsula renale (Fig. 1 C)¹⁷. Oltre a

supportare la crescita dei tessuti milza e timo umano, il modello NSG topo umanizzato HSIS-sostiene la ricostituzione dei nodi linfatici immunodeficienti-murino e milza (Fig. 1 C)¹⁷. L'analisi istochimica della pelle umana in topi NSG umanizzati con hSIS dimostra lo sviluppo dello xenotrapianto di pelle umana; microanatomia della pelle umana alle settimane dieci post-trapianto è paragonabile a quella di un adulto umano, con strati multipli di cellule presenti nell'epidermide (Fig. 2A, complementare Fig. 3). Lo xenotrapianto di pelle umana ha mostrato più strati di cheratinociti umani (AE1 / AE3, anticorpo pan-citocheratina + cellule) nell'epidermide e fibroblasti dermici (anticorpo anti-fibroblasti + cellule) nel derma (Fig. 2 B). Inoltre, la pelle umana esposta ripopolamento umano cellule immunitarie (CD45 umani + cellule), comprese le cellule di Langerhans (+ cellule hCD207), macrofagi (hCD68 +), e le cellule T (hCD3 +) (Fig. 2 B, complementare Figg. 4 e 5). La pelle umana nei topi NSG umanizzati con hSIS mostrava anche una sovraregolazione delle cellule muscolari alfa-lisce actina positive (α -SMA⁺) (cioè cellule dei vasi sanguigni⁴⁵) durante la rivascolarizzazione e la guarigione della ferita (~ 2 settimane dopo il trapianto), seguita da una riduzione delle cellule α -SMA⁺ nella pelle guarita (~ 10 settimane dopo il trapianto) (Fig. 2 B). Analisi istochimica dimostra lo sviluppo dei tessuti co-trapiantati umane linfoidei (milza e timo) nella capsula renale (~ 10 settimane dopo il trapianto) (Fig. 2 C)¹⁷. Tessuto del timo umano in topi NSG HSIS-umanizzato presenta cellule T (umani CD3⁺ cellule) ricostituzione, con poche cellule B nel tessuto (Fig. 2 C)^{17,46,47}. Ricostituzione dei macrofagi (CD68 umano⁺ cellule) nel tessuto timo umano è limitato al midollo (Fig. 2 C)^{17,46,47}. Il tessuto della milza umana nei topi NSG umanizzati con hSIS mostra la ricostituzione dei macrofagi, con macrofagi prevalentemente nella polpa rossa (Fig. 2 C)^{15,16}. Il tessuto milza umana in topi NSG HSIS-umanizzato esibisce T e B ripopolamento cellulare (umana CD3⁺ e CD20⁺ cellule), con i linfociti prevalentemente nella polpa bianca (Fig. 2 C)¹⁵. Analisi delle PBMC nei topi NSG HSIS-umanizzato ha mostrato cellule ricostituzione immunitario umano (cellule hCD45 +) (Fig. 3A, B). Vari sottotipi di cellule immunitarie umane (hCD45 +), vale a dire, cellule T $\alpha\beta$ (cellule T $\alpha\beta$ con un rapporto CD4: CD8 medio di 1,34: 1), cellule T $\gamma\delta$ ($\gamma\delta$ T), cellule NK (hNK), cellule B (hB), monociti (HMO) e granulociti / neutrofilii polimorfocitici (HPMN) sono state ricostituite nel sangue periferico del modello NSG topo HSIS-umanizzato (Fig. 3 C, D), con l'analisi eseguita usando controlli per analisi appropriato citometria a flusso (complementare Fig. 6).

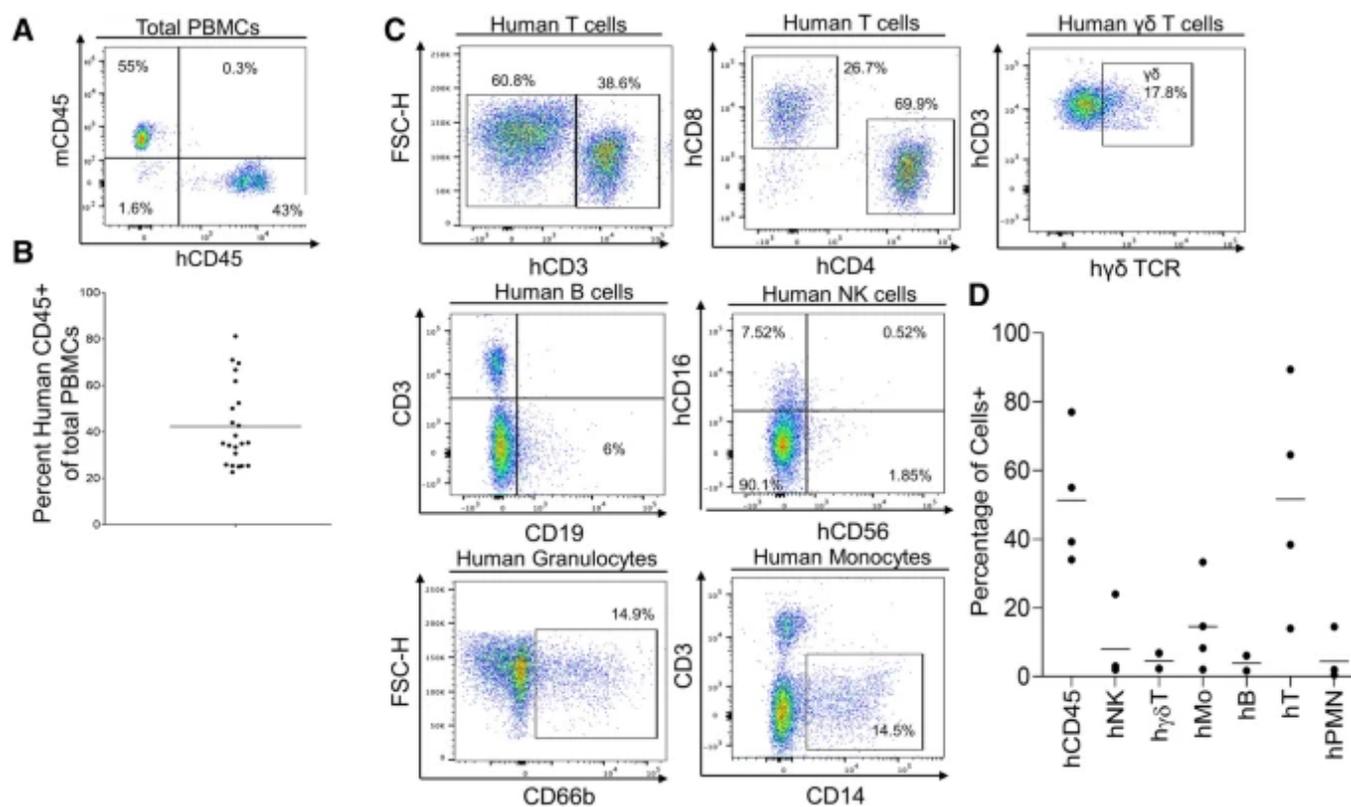
Figura 1

Sviluppo di pelle umana e tessuti linfoidei nel modello murino NSG umanizzato con sistema immunitario e pelle umana. Il trapianto di pelle umana a tutto spessore (derivato dal cuoio capelluto per la pelle con capelli o derivato dal dorso per la pelle senza capelli) sul dorso (**A** , **B**) e sui tessuti linfoidei autologhi nella capsula renale (**C**) dei topi NSG risulta l'attecchimento e lo sviluppo della pelle umana a tutto spessore e dei tessuti linfoidei. (**A**) Foto lorde rappresentative a 0 (il giorno del trapianto), 2, 4 e 10 settimane dopo il trapianto, con pelle di topo intatta come controllo (n = 4 per gruppo). (**B**) Il trapianto di pelle umana a tutto spessore da regioni con follicoli piliferi significativi (cuoio capelluto) nel modello murino di NSG umanizzato con pelle e sistema immunitario umano risulta nello sviluppo di capelli umani, come mostrato in foto rappresentative grossolane a 12 settimane dopo il trapianto (n = 6). (**C**) Foto grossolane rappresentative di tessuti linfoidei umani (milza e tessuti del timo) e tessuti linfoidei umanizzati (linfonodi murini immunodeficienti ricostituiti e milza) a dieci settimane dopo il trapianto (n = 4).

figura 2



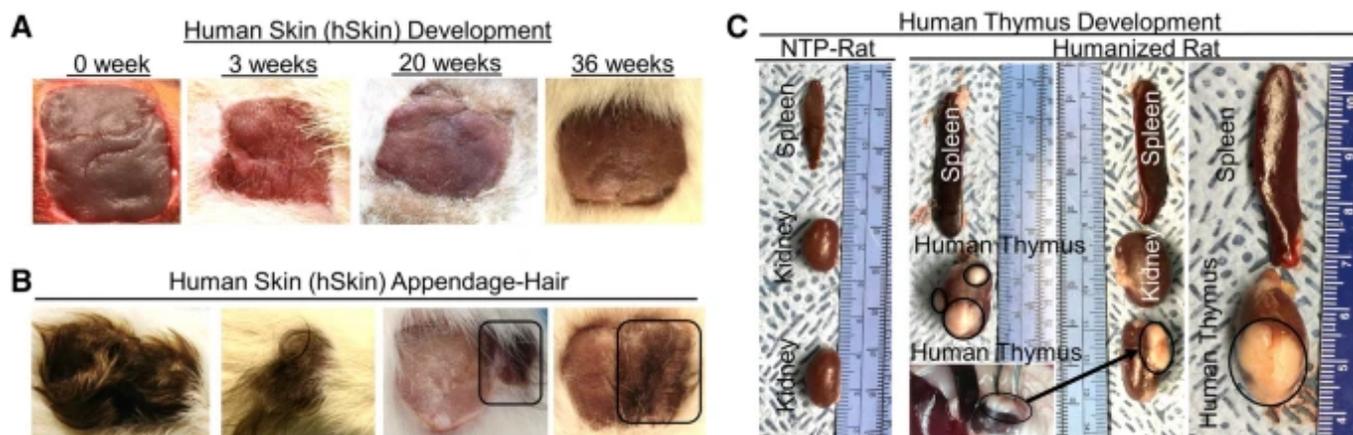
Sviluppo di pelle umana e cellule immunitarie nel modello murino NSG umanizzato con pelle umana e sistema immunitario. (**A**) L'analisi istologica rappresentativa (H&E) della pelle umana in topi NSG umanizzati con pelle umana e sistema immunitario (n = 4) dimostrano lo sviluppo della pelle umana di tipo adulto, compreso il derma, l'epidermide dello strato multicellulare (> 5 strati) e busta cornificata. L'analisi istologica rappresentativa (H&E) della pelle del topo mostra uno strato sottile di cellule epidermiche, con uno strato dermico sottile. (**B**) Diverse cellule della pelle umana sono presenti nella pelle umana, inclusi cheratinociti (cellule AE1 / AE3 +, cellule hCitocheratine +), fibroblasti dermici (cellule TE7 +, cellule hFibroblast +), cellule immunitarie cutanee (cellule hCD45 +) e cellule di Langerhans (hCD207 +); Le cellule dei vasi sanguigni che esprimono l'actina muscolare alfa (cellule hα-SMA +) sono presenti nello xenotrapianto di pelle umana e si espandono durante la guarigione della ferita e si contraggono dopo la guarigione (n = 4). Le frecce nere indicano cellule IHC + rappresentative. (**C**) L'analisi istologica e immunoistochimica rappresentativa della milza umana e del timo (entrambi sotto la capsula renale) in topi NSG umanizzati con pelle e sistema immunitario umani dimostrano lo sviluppo di quei tessuti linfoidei a dieci settimane dal trapianto, con macrofagi umani (hCD68 +), Cellule T (hCD3 +), cellule B (hCD20 +) presenti nei tessuti (n = 4) Barre della scala: 200 μm.

Figura 3

Sviluppo di cellule mononucleate di sangue periferico umano nel modello murino NSG umanizzato con pelle e sistema immunitario umano. (**A**) L'analisi rappresentativa della citometria a flusso della ricostituzione delle cellule immunitarie umane (hCD45 +) nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di topi NSG umanizzati dalla pelle e dal sistema immunitario umani a 10-12 settimane dopo il trapianto dimostra livelli elevati (> 10%) di cellule immunitarie umane nel sangue. (**B**) Quantificazione della ricostituzione delle cellule immunitarie umane (n = 22; 3 esperimenti indipendenti) in PBMC di topi umanizzati con hSIS a 10 settimane dal trapianto. (**C**) L'analisi rappresentativa della citometria a flusso di PBMC umane (hCD45 + PBMC) in topi umanizzati con pelle umana e sistema immunitario a 10-12 settimane dopo il trapianto dimostra livelli facilmente rilevabili di vari tipi di cellule immunitarie umane (cellule B-hCD19 + hCD3- PBMC umane, Cellule $\alpha\beta$ T-hCD3 + PBMC umane, hCD4 + cellule T, hCD8 + cellule T, h $\gamma\delta$ TCR + cellule T- h $\gamma\delta$ TCR + CD3 + PBMC umane, cellule natural killer (NK) -hCD57 + hCD3- PBMC umane, monociti (hMo) -hCD14 + CD3- PBMC umane e granulociti (hPMN) -hCD66b + hCD3- PBMC umane). (**D**) Quantificazione dei sottotipi di cellule immunitarie umane

(n = 4) in PBMC umane (hCD45 + PBMC) di topi umanizzati con pelle umana e sistema immunitario a 10-12 settimane dopo il trapianto.

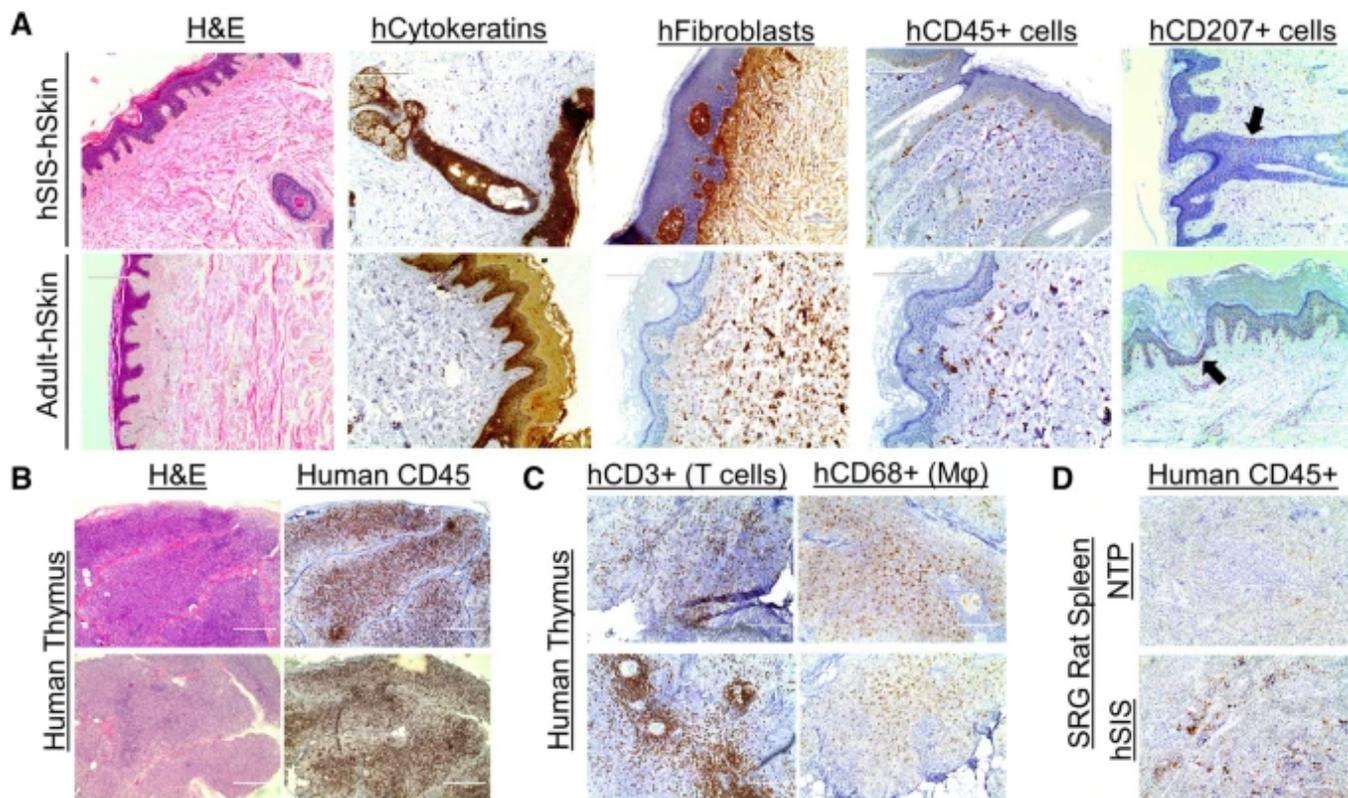
Figura 4



Sviluppo di pelle umana e tessuti linfoidei nel modello di ratto SRG umanizzato con pelle umana e sistema immunitario. Il trapianto di pelle fetale umana a tutto spessore sul dorso (**A** , **B**) e sui tessuti linfoidei fetali autologhi (timo e fegato) nella capsula renale (**C**) di ratti SRG provoca l'attecchimento e lo sviluppo della pelle umana a tutto spessore e del linfoide primario tessuto (timo) (n = 4). (**A**) Le foto grossolane rappresentative a 0 (il giorno del trapianto), 3, 20 e 36 settimane dopo il trapianto dimostrano l'attecchimento e lo sviluppo della pelle fetale umana (utilizzando la pelle del donatore ottenuta dal dorso). (**B**) Trapianto di pelle fetale umana a tutto spessore, derivata da regioni con follicoli piliferi significativi (cuoio capelluto), su ratti SRG con (pannello sinistro) (n = 2) o senza (pannello destro) (n = 2) co-trapianto di timo e le cellule staminali ematopoietiche determinano lo sviluppo di capelli umani come mostrato in foto grossolane rappresentative a sei mesi dal trapianto. Nel pannello di destra, pelle umana autologa dal dorso e dal cuoio capelluto è stata co-trapiantata per dimostrare che i capelli umani crescono solo nel tessuto della pelle umana con follicoli piliferi preesistenti (cuoio capelluto; identificato con una scatola nera). (**C**) Foto macroscopiche rappresentative dei tessuti linfoidei (timo umano nella capsula renale e milza di ratto) nove mesi dopo il trapianto dimostrano lo sviluppo di

tessuti linfoide rispetto al ratto SRG non trapiantato ($n = 4$). I cerchi neri indicano i tessuti del timo umano.

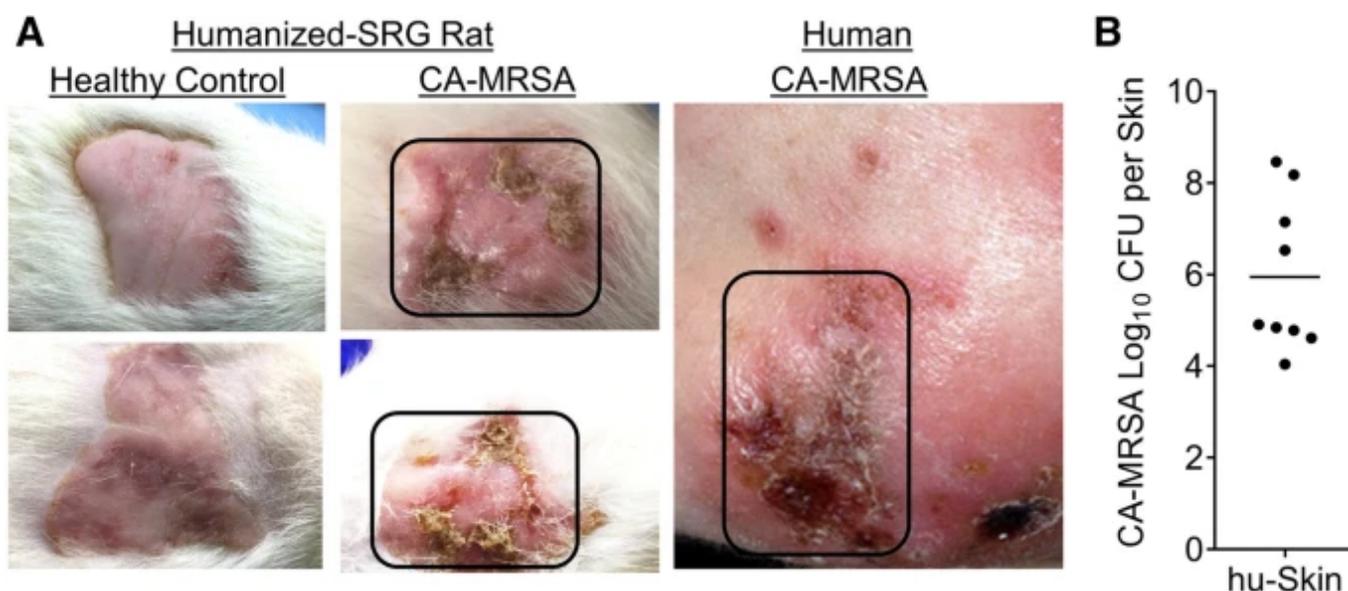
Figura 5



Sviluppo della pelle umana e delle cellule immunitarie nel modello di ratto SRG umanizzato con pelle umana e sistema immunitario. L'analisi immunoistochimica rappresentativa della pelle umana nel ratto umanizzato con pelle umana e sistema immunitario ($n = 4$) dimostra lo sviluppo della pelle umana, compreso il derma, l'epidermide multistrato (> 5 strati) e l'involucro cornificato, che sono pelle umana adulta (Adult-hSkin) ($n = 2$) (**A**). Varie cellule della pelle umana sono presenti nella pelle umana, inclusi cheratinociti (cellule AE1 / AE3 +, cellule hCitocheratine +), fibroblasti dermici (cellule TE7 +, cellule hFibroblast +), cellule immunitarie cutanee (cellule hCD45 +) e cellule di Langerhans (hCD207 +; le frecce nere indicano Cellule IHC +) ($n = 4$). (**B**) L'analisi istologica e immunoistochimica rappresentativa del timo umano (sotto la capsula renale) nel ratto SRG umanizzato con pelle e sistema immunitario umano dimostra lo sviluppo del tessuto del timo umano a nove mesi dal

trapianto, con cellule immunitarie umane (CD45 + umano), compresi (**C**) alti livelli di cellule T (hCD3 +) e macrofagi (hCD68 +) (n = 4). (**D**) La milza di ratto nel modello di ratto SRG umanizzato con pelle e sistema immunitario umano (n = 4) viene anche ricostituita con cellule immunitarie umane (Humans CD45 +); Ratto SRG non trapiantato (NTP) (n = 2) è stato utilizzato come controllo della colorazione. Barre della scala: 200 μ m.

Figura 6



Lo xenotrapianto di pelle umana su ratti SRG supporta l'infezione da CA-MRSA. Lo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (CA-MRSA) associato alla comunità è stato inoculato in xenotrapianto di pelle umana (iniezione intradermica) su ratti SRG umanizzati (pelle umana) (n = 9) per dimostrare che lo xenotrapianto di pelle umana supporta l'infezione da CA-MRSA. (**A**) L'analisi grossolana dei tessuti cutanei è stata esaminata in ratti SRG umanizzati (pelle umana) inoculati con CA-MRSA (n = 9) e confrontati con pelle umana infetta con CA-MRSA (credito fotografico della pelle del paziente CA-MRSA: S. Camazine) ; Come controllo per determinare le lesioni cutanee è stata utilizzata anche pelle umana di controllo sana in ratti SRG umanizzati (pelle umana) (n = 5). (**C**) Le lesioni cutanee nei ratti SRG

umanizzati (pelle umana) inoculati con CA-MRSA (n = 9) supportano una carica batterica CA-MRSA elevata misurata sei settimane dopo l'infezione.

Il modello di ratto SRG umanizzato con hSIS supporta lo sviluppo di pelle umana a tutto spessore, tessuti del timo e cellule immunitarie umane

Sebbene i topi umanizzati abbiano fornito piattaforme in vivo per la modellazione di malattie umane, la breve durata della vita e le piccole dimensioni / volume del tessuto dei topi sono una limitazione importante per gli studi a lungo termine e preclinici, rispettivamente. Abbiamo ipotizzato che un modello di roditore immunodeficiente più grande, con una durata di vita più lunga, vale a dire il ratto, sosterebbe lo sviluppo di un modello in vivo per studi a lungo termine (> 6 mesi) e fornirebbe un grande volume / dimensione del tessuto. Abbiamo inoltre ipotizzato che il co-trapianto di pelle fetale umana a tutto spessore, tessuti autologhi del timo fetale, tessuti epatici fetali autologhi e cellule staminali ematopoietiche autologhe derivate dal fegato fetale nel ratto SRG consentirebbe lo sviluppo di un modello contenente pelle umana, autologa timo e cellule immunitarie umane autologhe, chiamate ratto SRG umanizzato con hSIS.³ pezzi) sono stati impiantati nelle capsule renali di ratti SRG irradiati e quei ratti sono stati immediatamente trapiantati utilizzando cellule staminali ematopoietiche autologhe. Il tessuto adiposo in eccesso è stato rimosso dalla pelle del feto umano e il tessuto è stato successivamente innestato sulla gabbia toracica, dove la pelle del ratto era stata precedentemente asportata. I ratti SRG sono stati trapiantati usando pelle umana più cellule staminali ematopoietiche umane CD34 + e tessuto del timo, o solo con pelle umana; Il 100% dei ratti ha innestato e sviluppato con successo i tessuti umani trapiantati (Figura 7 supplementare). Tuttavia, una ricostituzione delle cellule immunitarie umane del sangue nei ratti trapiantati non è stata osservata in nessun gruppo che utilizzava questa metodologia di trapianto (dati non mostrati). L'analisi grossolana della pelle umana nei ratti trapiantati con cellule staminali ematopoietiche umane CD34 + più timo e pelle ha dimostrato la guarigione della ferita, a partire da tre settimane dopo il trapianto, e la maturazione nel tempo in pelle umana simile ad un adulto (Fig. 4 A). La pelle umana trapiantata su SRG (con o senza il tessuto linfoide inclusa + cellule staminali ematopoietiche CD34) anche sostenere lo sviluppo di appendici pelle umana (capelli) (Fig. 4B). L'analisi grossolana dei tessuti linfoidei nei ratti SRG

umanizzati con hSIS a nove mesi dal trapianto ha mostrato la crescita del tessuto timico umano nella capsula renale e l'aumento marginale delle dimensioni della milza di ratto (Fig. 4 C). La pelle umana nei ratti SRG umanizzati con hSIS ha mostrato lo sviluppo di cheratinociti umani multistrato (AE1 / AE3, anticorpo pan-citocheratina + cellule) nell'epidermide e fibroblasti dermici (anticorpi anti-fibroblasti + cellule) nel derma, entrambi paragonabili alla pelle umana adulta (Adult-hSkin) e differiscono dalla pelle di ratto (Fig. 5 A, Figura supplementare 8). La pelle umana nei ratti SRG umanizzati con hSIS ha mostrato una ricostituzione delle cellule immunitarie umane (cellule hCD45⁺), comprese le cellule di Langerhans (hCD207⁺ Cellule), paragonabili a pelle umano adulto (Adult-Hskin) (Fig. 5 A). L'analisi istochimica del tessuto del timo umano in ratti SRG umanizzati con hSIS a nove mesi dal trapianto dimostra lo sviluppo del timo, inclusa la presenza di lobuli timici (Fig. 5 B). Tessuti umani timo nella cella immunitario umano HSIS-umanizzati SSR ratto mostre (CD45 umano⁺ cellule) ricostituzione, comprese cellule T (CD3 umani⁺ cellule) e macrofagi (umani CD68⁺ cellule) ricostituzione (Fig. 5 B, C). Inoltre, le cellule T timiche umane mostrano una risposta delle citochine alla stimolazione utilizzando sfere CD3 / CD28 (Figura complementare 9). Le cellule immunitarie umane nel ratto SRG umanizzato con hSIS ricostituiscono anche la milza di ratto immunodeficiente (Fig. 5 D).

Il xenotrapianto pelle umana in immunodeficienti modelli di roditori supporti comunità associata alla meticillina-resistente *Staphylococcus aureus* infezione

L'infezione da *Staphylococcus aureus* resistente alla *meticillina* (CA-MRSA) associata alla comunità rappresenta una significativa minaccia per la salute pubblica⁵; quindi, i modelli in vivo che consentono lo studio delle infezioni della pelle umana sono importanti. Al fine di dimostrare che gli xenotrapianti di pelle umana fetale derivati dalla pelle nei roditori immunodeficienti forniscono un mezzo per indagare sulle infezioni della pelle umana, abbiamo inoculato (intradermico) gli xenotrapianti di pelle umana di tipo adulto con CA-MRSA USA300. Abbiamo osservato lesioni nella pelle umana nei ratti SRG inoculati con CA-MRSA, che erano paragonabili alle lesioni nei pazienti con CA-MRSA; tali pelle umana lesioni nei ratti esposti crescita batterica CA-MRSA (Fig. 6). L'inoculazione di CA-MRSA nello xenotrapianto di pelle umana nel modello murino NSG a 10-12 settimane dopo il trapianto, supporta anche la crescita batterica (Figura 10 supplementare).

Discussione

I modelli di roditori sono le piattaforme principali per indagare su infezioni, lesioni e malattie associate alla pelle umana^{10,43}. Sebbene i modelli di roditori forniscano informazioni sui meccanismi delle malattie umane e sulla risposta / difesa dell'ospite contro gli agenti infettivi associati alla pelle, esistono diverse limitazioni nei modelli di roditori^{10,43}. È ben noto che la pelle umana presenta differenze strutturali significative rispetto alla pelle di roditori^{10,43}. Queste differenze strutturali potrebbero svolgere un ruolo critico nelle interazioni pelle-microbi e nella segnalazione immunitaria cutanea, con conseguenti differenze significative nella difesa antimicrobica dell'ospite e nella risposta infiammatoria tra la pelle umana e quella dei roditori^{1,2}. Queste differenze potrebbero anche avere un impatto significativo sulla traduzione dei risultati meccanicistici dai modelli tradizionali di roditori all'uomo.

Nel tentativo di affrontare le differenze di specie tra i modelli tradizionali di roditori di malattie della pelle umana e malattie della pelle negli esseri umani, abbiamo innestato pelle umana, tessuti linfoidei autologhi e cellule staminali ematopoietiche autologhe in roditori immunodeficienti (ratti SRG e topi NSG). La pelle umana innestata nei roditori immunodeficienti ha sviluppato una struttura microanatomica che somigliava alla pelle umana adulta. Cheratinociti umani e fibroblasti dermici, che facilitano lo sviluppo di epidermide e derma multistrato, rispettivamente, erano presenti nella pelle umana sia dei ratti che dei topi umanizzati con hSIS. Per stabilire che lo xenotrapianto di pelle umana su ratti immunodeficienti è suscettibile agli agenti patogeni umani, abbiamo infettato la pelle umana innestata con CA-MRSA tramite inoculazione intradermica. Lo xenotrapianto di pelle umana nel modello di ratto hSIS supporta l'infezione da CA-MRSA. La pelle umana nel modello murino umanizzato hSIS supporta anche l'infezione da CA-MRSA, sebbene l'infezione sembri indurre una morte rapida entro tre giorni. Prince et al. hanno riferito che i neutrofili umani e i macrofagi derivati dai monociti sono un bersaglio per la leucocidina Pantone-Valentine (PVL) associata a CA-MRSA in topi umanizzati con cellule immunitarie umane e xenotrapianto di timo⁴⁸; quindi, una maggiore infiammazione potrebbe mediare le morti rapide. Nel modello murino NSG umanizzato con hSIS, abbiamo osservato livelli facilmente rilevabili di monociti / macrofagi umani nel sangue e nella pelle umana. Studi futuri studieranno le interazioni tra le perturbazioni delle cellule immunitarie umane e CA-MRSA nella pelle infetta. Una

limitazione del modello murino umanizzato con hSIS è la breve finestra sperimentale (<2,5 mesi) per l'infezione, poiché l'essiccamento dello xenotrapianto di pelle umana (con conseguente indurimento) e i primi segni di perdita di capelli murina (indicativo di malattia del trapianto contro l'ospite) sono evidenti circa cinque mesi dopo il trapianto. I ratti SRG umanizzati con hSIS non mostrano segni di malattia da trapianto contro l'ospite, anche a nove mesi dopo il trapianto; quindi,

Diverse popolazioni di leucociti mediano la risposta immunitaria umana; il modello murino umanizzato hSIS supporta lo sviluppo di cellule immunitarie innate e adattive. Il sangue periferico dei topi umanizzati con hSIS viene ricostituito con linfociti, granulociti, monociti, cellule dendritiche e cellule natural killer. Inoltre, il modello murino umanizzato con hSIS supporta lo sviluppo del timo umano e dei tessuti della milza. La presenza di questi tessuti linfoide primari e secondari umani, insieme allo sviluppo di cellule immunitarie innate e adattive, può consentire a questo modello di ricapitolare le risposte immunitarie umane antigene-specifiche de novo a un'infezione della pelle. È interessante notare che il modello di ratto umanizzato con hSIS ha mostrato una ricostituzione marginale delle cellule immunitarie umane nel sangue periferico, nonostante l'evidenza della ricostituzione delle cellule immunitarie umane nella pelle e nel timo umani, così come la milza di ratto. Una variante transgenica del modello di ratto SRG, che trasporta la proteina di regolazione del segnale umano alfa, un regolatore negativo della fagocitosi dei macrofagi, potrebbe facilitare la ricostituzione delle cellule immunitarie umane nel sangue⁴⁹,⁵⁰.

In sintesi, segnaliamo lo sviluppo di modelli di topo NSG umanizzato e di ratto SRG che incorporano tessuto linfoide umano e pelle umana autologa a tutto spessore con cellule immunitarie cutanee. I topi NSG umanizzati con hSIS e i ratti SRG potrebbero fornire un mezzo per studiare le infezioni della pelle^{25, 48, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60}.

Metodi

Costruzione di roditori umanizzati con pelle umana e sistema immunitario

Roditori adulti (8-10 settimane) maschi e femmine gravemente immunodeficienti, vale a dire topi del ceppo diabetico non obeso (NOD) (Jackson Laboratory, codice 005557) e ratti del ceppo Sprague Dawley (SD) (Hera Biolabs), portatori di mutazioni nell'interleuchina -2 subunità gamma del recettore (IL2R γ), così come nella proteina chinasi, DNA-attivato, subunità catalitica (PRKDC) (solo topi) o gene di attivazione della ricombinazione 2 (RAG2) (solo ratto) sono stati ottenuti dal fornitore e allevati nella struttura della divisione delle risorse animali da laboratorio (DLAR) presso l'Università di Pittsburgh. I tessuti fetali umani sono stati ottenuti dalla Health Sciences Tissue Bank dell'Università di Pittsburgh. I tessuti fetali umani per la costruzione di roditori umanizzati sono stati manipolati e processati in condizioni di livello 2 di biosicurezza. Roditori maschi e femmine sono stati myoablated tramite radiazioni gamma utilizzando un irradiatore di cesio-137, con topi che ricevono una dose di 150 rad e ratti che ricevono una dose di 500 rad. Topi maschi e femmine mioablatis sono stati trapiantati con feto-timo umano, fegato e milza nella capsula renale, CD34 autologo⁺ cellule staminali ematopoietiche (tramite iniezione retroorbitale di $0,2 \times 10^6$ cellule)¹⁷ e pelle fetale umana a tutto spessore sul pannicolo carnosus del dorso asportato dalla pelle del topo^{61, 62, 63}. Ratti maschi e femmine Myoablated sono stati trapiantati con fetale umano-timo e fegato nella capsula renale, autologhe CD34⁺ cellule staminali ematopoietiche (mediante iniezione retroorbital di $0,5 \times 10^6$ cellule), e autologo cute fetale umana tutto spessore (meno di quattro giorni vecchio) sul pannicolo carnosus del dorso asportato di pelle di ratto^{61, 62, 63}. In alcuni casi, i roditori sono stati trapiantati solo con pelle fetale umana a tutto spessore. I roditori sono stati alloggiati in condizioni prive di patogeni specifici e alimentati con cibo irradiato e acqua autoclavata.

Ricostituzione delle cellule immunitarie e saggi funzionali

Per valutare la ricostituzione delle cellule immunitarie umane nei punti temporali indicati, il sangue periferico è stato raccolto dagli animali e i leucociti sono stati analizzati utilizzando la citometria a flusso¹⁷. In breve, il sangue periferico è stato raccolto dai roditori e miscelato con acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) 20 mM in un rapporto 1: 1 e i leucociti monocellulari sono stati preparati tramite lisi dei globuli rossi utilizzando il tampone ammonio-cloruro-potassio (ACK). Per valutare la ricostituzione immunitaria umana nello xenotrapianto di pelle umana nel modello murino umanizzato hSIS, il tessuto cutaneo umano è stato asportato da un topo

umanizzato hSIS. I campioni di pelle sono stati tagliati in piccoli e digeriti con collagenasi. Il derma è stato separato dall'epidermide ed è stata creata una sospensione monocellulare di tessuto dermico utilizzando un dissociatore gentleMACS (Miltenyi Biotech). I tessuti epidermici sono stati sottoposti a tripsinizzazione per ottenere una sospensione unicellulare. Le sospensioni monocellulari sono state colorate con un kit di colorazione delle cellule morte Aqua Fixable LIVE / DEAD (ThermoFisher Scientific) e anticorpi coniugati con fluorocromo (anti-topo CD45-BioLegend Cat. No. 103126, anti-human CD45-BioLegend Cat. No. 304014), fissato con formalina e analizzato su un analizzatore cellulare BD LSRFortessa™ — citometro a flusso (BD Biosciences). I dati sono stati analizzati utilizzando il software FlowJo (Dako). I leucociti sono stati selezionati in base alle misurazioni della dispersione frontale e laterale. Leucociti unicellulari e vivi sono stati selezionati per ulteriori analisi della percentuale di leucociti umani (anti-CD45 umano I leucociti sono stati selezionati in base alle misurazioni della dispersione in avanti e laterale. Leucociti unicellulari e vivi sono stati selezionati per ulteriori analisi della percentuale di leucociti umani (anti-CD45 umano I leucociti sono stati selezionati in base alle misurazioni della dispersione frontale e laterale. Leucociti unicellulari e vivi sono stati selezionati per ulteriori analisi della percentuale di leucociti umani (anti-CD45 umano⁺, hCD3⁺, hCD4⁺, CD8⁺, hγδTCR⁺, hCD19⁺, hCD14⁺, hCD16⁺, hCD66b⁺) e leucociti di topo (anti-mouse CD45⁺). L'analisi delle varie popolazioni e sottoinsiemi di cellule immunitarie umane è stata controllata sui leucociti umani. Le cellule T umane sono state anche isolate dal tessuto del timo in ratti SRG umanizzati tramite selezione immunomagnetica utilizzando un anticorpo anti-CD3 umano (EasySep™ Human CD3 Positive Selection, n. Catalogo 17951, Stemcell Technologies) e trattate senza (veicolo) o con Gibco™ Dynabeads™ Attivatore T umano CD3 / CD28 (Cat. No. 111.61D, ThermoFisher Scientific) in presenza di IL2 ricombinante e BD GolgiPlug (BD Biosciences) per 12 h. L'espressione delle citochine umane (hTNFα e hIFNγ) nelle cellule T umane è stata analizzata utilizzando l'analizzatore di cellule BD LSRFortessa™ — citometro a flusso (BD Biosciences), e i dati sono stati analizzati utilizzando il software FlowJo (Dako).

Analisi delle cellule immunitarie grossolane / in situ

L'analisi complessiva dei tessuti è stata eseguita utilizzando una fotocamera (8 megapixel), con gli animali sottoposti a eutanasia o anestetizzati prima della fotografia. Campioni di tessuto indicati

da roditori umanizzati o umani (pelle umana adulta di un maschio di 77 anni, BioChain, numero di catalogo: T2234218 o pelle del seno di una femmina adulta, Repository di biospecimazioni dell'Università di Pittsburgh), sono stati fissati con formalina e, successivamente, incorporati in paraffina. Le sezioni fisse incluse in paraffina sono state colorate tramite ematossilina ed eosina o tramite anticorpi umani indicati ¹⁷(anti-human CD45-Biocare Medical Cat. No. CME PM016AA; anti-human CD3-Biocare Medical Cat. No. CME 324 A, B, C; anti-human CD68-Biocare Medical numero di catalogo CM 033 A, B, C ; anti-human CD20-Biocare Medical numero di catalogo ACR 3004 A, B; anti-human alfa-actina muscolare liscia; anti-pan citocheratina, clone AE1 / AE3, numero di catalogo Biocare Medical SKU: 011; anti-fibroblasti umani, clone TE7 , Numero di catalogo Millipore Sigma CBL271; anti-human CD207, numero di catalogo Dendritics: DDX0362). L'immunoreattività degli anticorpi è stata determinata mediante incubazione con substrato DAB (MACH 2 Detection Kit, Biocare Medical) e controcolorazione con ematossilina.

Infezione da CA-MRSA nella pelle umana nei roditori immunodeficienti

Gli xenotrapianti di pelle umana sui roditori immunodeficienti (ratti SRG e topi NSG) sono stati inoculati con CA-MRSA USA300 ⁶⁴ tramite iniezione intradermica con 1×10^8 CFU per i ratti e 1×10^6 CFU per i topi; roditori non trapiantati sono stati inoculati tramite iniezione sottocutanea allo stesso dosaggio. Dopo tre giorni, porzioni di pelle umana o di roditore di uguale peso sono state asportate e la carica batterica è stata determinata in base al numero di unità formanti colonie (CFU); Il ceppo batterico CA-MRSA è stato confermato tramite reazione a catena della polimerasi (PCR).

Approvazione etica

Tessuti fetali umani deidentificati all'età gestazionale di 18-20 settimane sono stati ottenuti da interruzione della gravidanza indicata dal punto di vista medico o elettivo tramite il Magee-Womens Hospital of the University of Pittsburgh Medical Center (UPMC), con l'Università di Pittsburgh, Health Sciences Tissue Banca. Il consenso informato scritto delle donatrici materne è stato ottenuto in tutti i casi, in base a un protocollo rivisto e approvato dall'Institutional Review Board (IRB) dell'Università di Pittsburgh; linee guida approvate e regolamenti federali / statali sono stati rispettati per tutte le procedure. L'uso di tessuti fetali umani deidentificati per costruire

roditori umanizzati è stato riesaminato e approvato dall'ufficio IRB dell'Università di Pittsburgh. L'uso di tessuti fetali umani de-identificati non ha costituito la ricerca su soggetti umani come definito dai regolamenti federali [45 CFR 46. 102 (d o f) e 21 CFR 56.102 (c), (e) e (l)]. L'uso di cellule staminali ematopoietiche derivate dal fegato fetale umano è stato esaminato e approvato dall'Human Stem Cell Research Oversight (hSCRO) presso l'Università di Pittsburgh. L'uso di un agente biologico (CA-MRSA), DNA ricombinante e animali transgenici sono stati esaminati e approvati dal Comitato Istituzionale di Biosicurezza (IBC) presso l'Università di Pittsburgh. Tutti gli studi sugli animali / protocolli sperimentali sono stati esaminati e approvati dal Comitato istituzionale per la cura e l'uso degli animali presso l'Università di Pittsburgh e sono stati condotti seguendo le linee guida approvate, che aderiscono alle linee guida NIH per l'alloggiamento e la cura degli animali da laboratorio. L'uso di cellule staminali ematopoietiche derivate dal fegato fetale umano è stato esaminato e approvato dall'Human Stem Cell Research Oversight (hSCRO) presso l'Università di Pittsburgh. L'uso di un agente biologico (CA-MRSA), DNA ricombinante e animali transgenici sono stati esaminati e approvati dal Comitato Istituzionale di Biosicurezza (IBC) presso l'Università di Pittsburgh. Tutti gli studi sugli animali / i protocolli sperimentali sono stati esaminati e approvati dal Comitato istituzionale per la cura e l'uso degli animali presso l'Università di Pittsburgh e sono stati condotti seguendo le linee guida approvate, che aderiscono alle linee guida NIH per l'alloggiamento e la cura degli animali da laboratorio. L'uso di cellule staminali ematopoietiche derivate dal fegato fetale umano è stato esaminato e approvato dall'Human Stem Cell Research Oversight (hSCRO) presso l'Università di Pittsburgh. L'uso di un agente biologico (CA-MRSA), DNA ricombinante e animali transgenici sono stati esaminati e approvati dal Comitato Istituzionale di Biosicurezza (IBC) presso l'Università di Pittsburgh. Tutti gli studi sugli animali / i protocolli sperimentali sono stati esaminati e approvati dal Comitato istituzionale per la cura e l'uso degli animali presso l'Università di Pittsburgh e sono stati condotti seguendo le linee guida approvate, che aderiscono alle linee guida NIH per l'alloggiamento e la cura degli animali da laboratorio. e animali transgenici sono stati esaminati e approvati dal Comitato Istituzionale di Biosicurezza (IBC) presso l'Università di Pittsburgh. Tutti gli studi sugli animali / i protocolli sperimentali sono stati esaminati e approvati dal Comitato istituzionale per la cura e l'uso degli animali presso l'Università di Pittsburgh e sono stati condotti seguendo le linee guida approvate, che aderiscono alle linee guida NIH per l'alloggiamento e la cura degli animali da laboratorio. e gli animali transgenici sono stati esaminati e approvati dal Comitato Istituzionale

di Biosicurezza (IBC) presso l'Università di Pittsburgh. Tutti gli studi sugli animali / i protocolli sperimentali sono stati esaminati e approvati dal Comitato istituzionale per la cura e l'uso degli animali presso l'Università di Pittsburgh e sono stati condotti seguendo le linee guida approvate, che aderiscono alle linee guida NIH per l'alloggiamento e la cura degli animali da laboratorio.

Disponibilità dei dati

I set di dati generati durante e / o analizzati dagli autori durante questo studio sono disponibili presso l'autore corrispondente su ragionevole richiesta.

Riferimenti

1. Balato, A. *et al.* Microbioma umano: composizione e ruolo nelle malattie infiammatorie della pelle. *Arco. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **67**, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00005-018-0528-4> (2019).
2. Byrd, AL, Belkaid, Y. & Segre, JA Il microbioma della pelle umana. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 143–155. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157> (2018).
3. Reynolds, ES, Hart, CE, Hermance, ME, Brining, DL e Thangamani, S. Una panoramica dei modelli animali per i virus trasmessi da artropodi. *Comput. Med.* **67**, 232–241 (2017).
4. Rhodes, J. & Fisher, MC Epidemiologia globale della *Candida auris* emergente. *Curr. Opin. Microbiol.* **52**, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.05.008> (2019).
5. Mediavilla, JR, Chen, L., Mathema, B. & Kreiswirth, BN Epidemiologia globale dello *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina associato alla comunità (CA-MRSA). *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 588–595. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.08.003> (2012).

6.

- Bernard, Q., Jaulhac, B. & Boulanger, N.** Pelle e artropodi: un'interazione efficace utilizzata dai patogeni nelle malattie trasmesse da vettori. *Euro. J. Dermatol.* **25** (Suppl 1), 18-22. <https://doi.org/10.1684/ejd.2015.2550> (2015).
- 7. Briant, L., Despres, P., Choumet, V. & Misse, D.** Ruolo delle cellule immunitarie della pelle sulla suscettibilità dell'ospite ai virus trasmessi dalle zanzare. *Virologia* **464–465**, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.06.023> (2014).
- 8. Kupper, TS & Fuhlbrigge, RC** Immune sorveglianza nella pelle: meccanismi e conseguenze cliniche. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 211–222. <https://doi.org/10.1038/nri1310> (2004).
- 9. Miller, LS & Cho, JS** Immunity contro le infezioni cutanee da *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 505–518. <https://doi.org/10.1038/nri3010> (2011).
- 10. Eyerich, S., Eyerich, K., Traidl-Hoffmann, C. & Biedermann, T.** Barriere cutanee e immunità cutanea: differenziare una rete connessa. *Tendenze Immunol.* **39**, 315–327. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.02.004> (2018).
- 11. Nicolas, JF & Guy, B.** Vaccinazione intradermica, epidermica e transcutanea: dall'immunologia alla pratica clinica. *Espresso Rev. Vac.* **7**, 1201–1214. <https://doi.org/10.1586/14760584.7.8.1201> (2008).
- 12. Combadiere, B. & Liard, C.** Vaccinazione transcutanea e intradermica. *Ronzio. Vac.* **7**, 811–827. <https://doi.org/10.4161/hv.7.8.16274> (2011).
- 13. Zomer, HD & Trentin, AG** Guarigione delle ferite cutanee nell'uomo e nei topi: sfide nella ricerca traslazionale. *J. Dermatol. Sci.* **90**, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.12.009> (2018).
- 14. Pasparakis, M., Haase, I. & Nestle, FO** Meccanismi che regolano l'immunità e l'infiammazione della pelle. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 289–301.

<https://doi.org/10.1038/nri3646> (2014).

15. Steiniger, BS Microanatomia della milza umana: perché i topi non sono sufficienti. *Immunologia* **145** , 334–346. <https://doi.org/10.1111/imm.12469> (2015).

16. Steiniger, B., Barth, P. & Hellinger, A. Le zone perifollicolari e marginali della polpa bianca splenica umana: i fibroblasti guidano l'immigrazione dei linfociti ?. *Am. J. Pathol.* **159** , 501–512. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61722-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61722-1) (2001).

17. Samal, J. *et al.* L'infezione da virus dell'immunodeficienza umana induce la fibrosi linfoide nel modello murino umanizzato BM-fegato-timo-milza. *JCI Insight* <https://doi.org/10.1172/jci.insight.120430> (2018).

18. Roozendaal, R. & Mebius, RE interazioni cellula-cellula immunitaria stromale. *Annu. Rev. Immunol.* **29** , 23–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101357> (2011).

19. Agarwal, Y. *et al.* Andare oltre la trappola per topi: modelli di topo e ratto umanizzati attuali ed emergenti per studiare strategie di prevenzione e cura contro l'infezione da HIV e patologie associate. *Retrovirology* **17** , 8. <https://doi.org/10.1186/s12977-020-00515-3> (2020).

20. Akkina, R. *et al.* Modelli animali di piccole dimensioni per virus dell'immunodeficienza umana (HIV), epatite B e tubercolosi: atti di un seminario NIAID. *Curr. HIV Res.* **18** , 19–28. <https://doi.org/10.2174/1570162X18666191223114019> (2020).

21. Victor Garcia, J. Topi umanizzati per la ricerca sull'HIV e l'AIDS. *Curr. Opin. Virol.* **19** , 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.06.010> (2016).

22. Shultz, LD, Brehm, MA, Garcia-Martinez, JV & Greiner, DL Topi umanizzati per le indagini sul sistema immunitario: progressi, promesse e sfide. *Nat. Rev. Immunol.* **12** , 786–798. <https://doi.org/10.1038/nri3311> (2012).

23. **23.** Walsh, NC *et al.* Modelli murini umanizzati di malattia clinica. *Annu. Rev. Pathol.* **12** , 187–215. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052016-100332> (2017).
- 24.** Klicznik, MM *et al.* Le cellule T di memoria cutanea residente CD4 (+) CD103 (+) umane si trovano nella circolazione di individui sani. *Sci Immunol.* <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aav8995> (2019).
- 25.** Tseng, CW *et al.* Maggiore suscettibilità dei topi NSG umanizzati alla leucocidina panton-valentine e all'infezione cutanea da *Staphylococcus aureus* . *PLoS Pathog.* **11** , e1005292. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005292> (2015).
- 26.** Wickersham, M. *et al.* Lo stress metabolico guida le difese dei cheratinociti contro l'infezione da *Staphylococcus aureus* . *Cell Rep.* **18** , 2742-2751. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.055> (2017).
- 27.** Soong, G. *et al.* Adattamento di *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina ai cheratinociti umani. *mBio.* <https://doi.org/10.1128/mBio.00289-15> (2015).
- 28.** Melican, K., Michea Veloso, P., Martin, T., Bruneval, P. & Dumenil, G. L'adesione di *Neisseria meningitidis* ai vasi dermici porta a danno vascolare locale e porpora in un modello murino umanizzato. *PLoS Pathog* **9** , e1003139. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003139> (2013).
- 29.** Schulz, A. *et al.* Il reclutamento dei neutrofili a MRSA non invasivo a livello dello strato corneo della pelle umana media la colonizzazione transitoria. *Cella Rep.* **29** , 1074-1081 E1075. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.055> (2019).
- 30.** Allen, TM *et al.* Modelli murini del sistema immunitario umanizzato: progressi, sfide e opportunità. *Nat. Immunol.* **20** , 770–774. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0416-z> (2019).
- 31.**

Etzioni, G. & Morgan, JR La sopravvivenza degli innesti di pelle fetale è prolungata sul modello di allotrapianto di pelle / topo immunodeficiente combinato di linfociti del sangue periferico umano ricostituito grave. *Transplantation* **73** , 519-528 (2002).

32. Lane, AT, Scott, GA e Day, KH Sviluppo di pelle fetale umana trapiantata su topo nudo. *J. Invest. Dermatol.* **93** , 787–791. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12284423> (1989).

33. Iannaccone, PM & Jacob, HJ Rats !. *Dis. Modelli Mech.* **2** , 206–210. <https://doi.org/10.1242/dmm.002733> (2009).

34. Brungger, A., Hubler, M. & Rohr, HP Innesti di pelle umana su ratti nudi atimici. Un modello sperimentale per la ricerca dermatologica. *Exp. Cell Biol.* **52** , 122–124 (1984).

35. Gilhar, A., Etzioni, A. & Krueger, GG Crescita dei capelli in innesti di pelle umana a spessore parziale trapiantati su ratti nudi: il ruolo della ciclosporina. *Dermatologica* **181** , 117–121. <https://doi.org/10.1159/000247898> (1990).

36. Gilhar, A. *et al.* Descrizione e trattamento per inibire il rigetto di innesti cutanei umani a spessore parziale da parte di ratti congenitamente atimici (nudi). *Exp. Cell Biol.* **54** , 263–274 (1986).

37. Petratos, PB *et al.* Trapianto di prepuzio umano a tutto spessore su ratti nudi come modello in vivo di guarigione di ferite umane acute. *Plast. Ricostruire Surg.* **111** , 1988–1997. <https://doi.org/10.1097/01.PRS.0000056831.87062.4B> (2003).

38. Noto, FK *et al.* Nuovi modelli di ratti immunodeficienti in grado di supportare la crescita di xenotrapianti di tumori umani. *Cancer Res.* **78** , 72-73 (2018).

39. Noto, FK *et al.* Il ratto SRG (TM): un nuovo ratto SCID per studi di umanizzazione. *Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/1538-7445.Am2018-1155> (2018).

40.

- 40.** Oliveira, VL *et al.* Il modello murino umanizzato di infiammazione della pelle è caratterizzato da differenziazione dei cheratinociti disturbata e afflusso di cellule T che producono IL-17A. *PLoS ONE* **7** , e45509 (2012).
- 41.** Watanabe, R. *et al.* La pelle umana è protetta da quattro popolazioni funzionalmente e fenotipicamente discrete di cellule T della memoria residenti e ricircolanti. *Sci. Transl. Med.* **7** , 279ra239 (2015).
- 42.** Hartmann-Fritsch, F., Biedermann, T., Braziulis, E., Meuli, M. & Reichmann, E. Un nuovo modello per i test preclinici dei sostituti dermici per la ricostruzione della pelle umana. *Pediatr. Surg. Int.* **29** , 479–488 (2013).
- 43.** Gudjonsson, JE, Johnston, A., Dyson, M., Valdimarsson, H. & Elder, JT Mouse modelli di psoriasi. *J. Invest. Dermatol.* **127** , 1292–1308 (2007).
- 44.** Lorenz, HP *et al.* Riparazione delle ferite senza cicatrici: un modello di pelle fetale umana. *Sviluppo* **114** , 253–259 (1992).
- 45.** Aneiros-Fernandez, J. *et al.* Espressione di smoothelin e actina muscolare liscia nella pelle. *Histol. Istopatolo.* **26** , 673–678. <https://doi.org/10.14670/HH-26.673> (2011).
- 46.** Hua, S. *et al.* Potenziale ruolo delle cellule T CD38- / HLA-DR + CD8 + specifiche per l'HIV nella soppressione virale e nella citotossicità nei controllori dell'HIV. *PLoS ONE* **9** , e101920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101920> (2014).
- 47.** Pearse, G. Normale struttura, funzione e istologia del timo. *Toxicol. Pathol.* **34** , 504–514. <https://doi.org/10.1080/01926230600865549> (2006).
- 48.** Prince, A., Wang, H., Kitur, K. & Parker, D. I topi umanizzati mostrano una maggiore suscettibilità alla polmonite da *Staphylococcus aureus* . *J. Infect. Dis.* **215** , 1386–1395. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw425> (2017).

49. **49.** Menoret, S. *et al.* Analisi in vivo delle risposte immunitarie umane nei ratti immunodeficienti. *Trapianto* **104** , 715–723. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003047> (2020).
- 50.** Yang, X. *et al.* Un modello di ratto modificato dal sistema immunitario per la ricerca sul trapianto di cellule staminali umane. *Stem Cell Rep.* **11** , 514–521. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.06.004> (2018).
- 51.** Spengler, JR *et al.* La gravità della malattia nei topi umanizzati infettati dal virus ebola o reston è associata all'entità della replicazione virale precoce nel fegato. *J. Infect. Dis.* **217** , 58–63. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix562> (2017).
- 52.** Jaiswal, S. *et al.* L'infezione da virus dengue induce anticorpi IgM umani ampiamente cross-reattivi che riconoscono i virioni intatti nei topi BLT-NSG umanizzati. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **240** , 67–78. <https://doi.org/10.1177/1535370214546273> (2015).
- 53.** Frias-Staheli, N. *et al.* Utilità dei topi BLT umanizzati per l'analisi dell'infezione da virus della dengue e per i test sui farmaci antivirali. *J. Virol.* **88** , 2205–2218. <https://doi.org/10.1128/JVI.03085-13> (2014).
- 54.** Jaiswal, S. *et al.* Risposte dei linfociti T specifiche per il virus della dengue umorale e con restrizioni per HLA-A2 in topi BLT NSG umanizzati. *Immunologia* **136** , 334–343. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2012.03585.x> (2012).
- 55.** Il tropismo del virus Mota, J. & Rico-Hesse, R. Dengue nei topi umanizzati ricapitola la febbre dengue umana. *PLoS ONE* **6** , e20762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020762> (2011).
- 56.** Kuruvilla, JG, Troyer, RM, Devi, S. & Akkina, R. Infezione da virus Dengue e risposta immunitaria in topi umanizzati RAG2 (- / -) gamma (c) (- / -) (RAG-hu). *Virology* **369** , 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.06.005> (2007).

57. **57.** Bente, DA, Melkus, MW, Garcia, JV e Rico-Hesse, R. Febbre dengue in topi NOD / SCID umanizzati. *J. Virol.* **79** , 13797–13799. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13797-13799.2005> (2005).
- 58.** Lee, EK *et al.* Effetti del profilo linfocitario sullo sviluppo di sottotipi di linfoma indotto da EBV in topi umanizzati. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112** , 13081–13086. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407075112> (2015).
- 59.** Whitehurst, CB *et al.* Knockout del virus BPLF1 di Epstein-Barr ritarda la trasformazione delle cellule B e la formazione di linfoma nei topi umanizzati. *mBio* **6** , e01574-01515 (2015).
- 60.** Wang, LX *et al.* Modello murino BLT umanizzato dell'infezione da herpesvirus associata al sarcoma di Kaposi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111** , 3146–3151. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318175111> (2014).
- 61.** Denton, PW *et al.* La somministrazione sistemica di antiretrovirali prima dell'esposizione previene la trasmissione dell'HIV-1 per via rettale e endovenosa nei topi BLT umanizzati. *PLoS ONE* **5** , e8829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008829> (2010).
- 62.** Denton, PW *et al.* Generazione della latenza dell'HIV nei topi BLT umanizzati. *J. Virol.* **86** , 630–634. <https://doi.org/10.1128/JVI.06120-11> (2012).
- 63.** Melkus, MW *et al.* I topi umanizzati montano risposte immunitarie adattive e innate specifiche a EBV e TSST-1. *Nat. Med.* **12** , 1316–1322. <https://doi.org/10.1038/nm1431> (2006).
- 64.** Mariani, R. *et al.* Gli eterocarioni uomo-topo supportano un assemblaggio efficiente del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1. *J. Virol.* **75** , 3141–3151. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.7.3141-3151.2001> (2001).

Ringraziamenti

Abbiamo utilizzato l'UPMC-Hillman Cancer Center e Tissue and Research Pathology presso l'Università di Pittsburgh Biospecimen Core, che è supportato in parte dal premio NIH P30CA047904. Miss Vanshika Narala e Miss Nivitha Periyapatna, Dipartimento di Malattie Infettive e Microbiologia, Università di Pittsburgh hanno collaborato alla raccolta di dati istologici e analisi. Berthony Deslouches, Dipartimento di Microbiologia e Genetica Molecolare, Università di Pittsburgh ha fornito consigli approfonditi sullo sviluppo di questo progetto. Questo lavoro è stato sostenuto dal National Institutes of Health (NIH) -National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) (R21AI135412) e dal National Institutes of Health (NIH) -Fogarty International Center (FIC) (D43TW010039). L'Istituto Superiore di Sanità, che finanzia questo lavoro,

Informazioni sull'autore

1. Questi autori hanno contribuito allo stesso modo: Yash Agarwal, Cole Beatty e Sara Ho.

Affiliazioni

1. Dipartimento di malattie infettive e microbiologia, Università di Pittsburgh, Pittsburgh, USA

Yash Agarwal, Cole Beatty, Sara Ho, Antu Das, Samantha Kelly, Isabella Castronova, Rajeev Salunke, Shivkumar Biradar e Moses Bility

2. Dipartimento di Microbiologia e Genetica Molecolare, Università di Pittsburgh, Pittsburgh, USA

Lance Thurlow e Anthony Richardson

3. Hera Biolabs, Inc, Lexington, USA

Tseten Yeshi

Contributi

MB, LT, TY e AR hanno ideato e progettato esperimenti nello studio. YA, CB, SH, AD, LT, RS, SK, SB, IC e MB hanno eseguito esperimenti. MB, AR, LT, YA e CB hanno analizzato e interpretato i dati. MB, YA, CB, SB, IC e SH hanno preparato il manoscritto.

autore corrispondente

Corrispondenza con [Moses Bility](#) .

Dichiarazioni etiche

Interessi conflittuali

Yash Agarwal, Cole Beatty, Sara Ho, Lance Thurlow, Antu Das, Samantha Kelly, Rajeev Salunke, Isabella Castronova, Shivkumar Biradar, Anthony Richardson e Moses Bility hanno dichiarato che non esiste alcun conflitto di interessi. Tseten Yeshi ha un conflitto di interessi finanziari, poiché lavora per HaraBiolabs, che fornisce commercialmente il ratto Sprague-Dawley-Rag2^{tm2hera} Il2r^γ tm1hera (SRG).

Informazioni aggiuntive

Nota dell'editore

Springer Nature rimane neutrale riguardo alle rivendicazioni giurisdizionali nelle mappe pubblicate e nelle affiliazioni istituzionali.

Informazione supplementare

Informazioni supplementari 1.

Diritti e autorizzazioni

Accesso aperto Questo articolo è concesso in licenza con una licenza internazionale Creative Commons Attribution 4.0, che consente l'uso, la condivisione, l'adattamento, la distribuzione e la riproduzione in qualsiasi mezzo o formato, a condizione che si attribuisca il credito appropriato all'autore / agli autori originali e alla fonte, fornire un collegamento alla licenza Creative Commons e indicare se sono state apportate modifiche. Le immagini o altro materiale di terze parti in questo articolo sono inclusi nella licenza Creative Commons dell'articolo, se non diversamente indicato in una linea di credito al materiale. Se il materiale non è incluso nella licenza Creative Commons dell'articolo e l'uso previsto non è consentito dalla normativa statutaria o eccede l'uso consentito, sarà necessario ottenere l'autorizzazione direttamente dal titolare del copyright. Per visualizzare una copia di questa licenza, visitare <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> .

Ristampe e autorizzazioni

A proposito di questo articolo

Cita questo articolo

Agarwal, Y., Beatty, C., Ho, S. *et al.* Sviluppo di modelli di topo e ratto umanizzati con pelle umana a tutto spessore e cellule immunitarie autologhe. *Sci Rep* **10**, 14598 (2020).

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-71548-z>

Ricevuto 09 ottobre 2019 **Accettato** 13 agosto 2020 **Pubblicato** 03 settembre 2020

DOI <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71548-z>