



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



---

# Efecte del tractament prenatal amb betametasona en el desenvolupament de la diabetis mellitus tipus 1

---



**David Perna Barrull**

TESI DOCTORAL, 10 de Desembre de 2019  
Badalona

Directora de la tesi:  
**Marta Vives-Pi**  
Immunologia de la diabetis  
Institut de Recerca Germans Trias i Pujol

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establerta per la següent llicència Creative Commons:



<https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:



<https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons licence :



<https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Programa de doctorat en Immunologia avançada  
Departament de Biologia cel·lular, Fisiologia i Immunologia  
Universitat Autònoma de Barcelona

## **Efecte del tractament prenatal amb betametasona en el desenvolupament de la diabetis mellitus tipus 1**

Effects of prenatal betamethasone treatment in the development of type 1 diabetes mellitus

Efecto del tratamiento prenatal con betametasona en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 1

Tesi presentada per David Perna Barrull per optar al grau de Doctor en Immunologia Avançada per la Universitat Autònoma de Barcelona

El treball presentat ha estat realitzat al grup *Immunologia de la diabetis*, al Institut de Recerca Germans Trias i Pujol (IGTP) i ha estat dirigida per la Dra Marta Vives Pi.

Badalona, 10 de desembre de 2019

**David Perna Barrull**

*Candidat a doctor*

**Dra. Marta Vives-Pi**

*Directora de la tesi*

Els treballs de recerca d'aquesta memòria s'han finançat a través del projecte de l'Institut de Salut Carlos III (Ministerio de ciencia, innovación y universidades) (FIS PI15/00198) del govern espanyol, cofinançat pel fons europeu de desenvolupament regional (FEDER), pel CIBER de Diabetis i Malalties Metabòliques associades (CIBERDEM) –una iniciativa de l'institut de Salut Carlos III- i amb el suport del Deutsche Forschungsgemeinschaft (KFO296). El grup *Immunologia de la diabetis* de l'Institut de Recerca Germans Trias i Pujol és membre del grup consolidat reconegut per l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (2017 SGR 103). Aquest treball també ha estat possible gràcies al mecenatge de la família Navalpotro-Cardús, a través d'Amics de Can Ruti.

Infografies: Figures creades amb la web app.Biorender.com i el programa Graphpad 7, David Perna Barrull.



La Dra. Marta Vives Pi, investigadora biomèdica de la Fundació d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol i Professora Associada del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

Certifica:

Que el treball experimental i la redacció de la memòria de la Tesi Doctoral ***“Efecte del tractament prenatal amb betametasona en el desenvolupament de la diabetis mellitus tipus 1”*** han estat realitzats per David Perna Barrull sota la seva direcció i considera que és apta per ser presentada per optar al grau de Doctor en Immunologia Avançada per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per tal que en quedi constància, signa aquest document a Badalona,  
el 4 de Novembre del 2019

Dra. Marta Vives Pi



*Als meus pares,*

*Rosana i Sisco.*

*I a la Núria.*





# Índex

ABREVIATURES.....	13
RESUM .....	17
SUMMARY.....	19
1. INTRODUCCIÓ.....	23
<b>1.1 La diabetis mellitus tipus 1 .....</b>	<b>23</b>
1.1.1 Història natural de la malaltia i patogènesi .....	23
1.1.2 Evolució de la incidència.....	32
1.1.3 Incidència entre familiars .....	33
1.1.4 Models experimentals: el ratolí no obès diabètic .....	34
<b>1.2 Factors prenatals i diabetis mellitus tipus 1. ....</b>	<b>36</b>
1.2.1 Desenvolupament del sistema immunitari prenatal .....	36
1.2.2 Desenvolupament del pàncrees fetal.....	39
1.2.3 Durada de la gestació com a factor de risc.....	40
<b>1.3 Glucocorticoides .....</b>	<b>42</b>
1.3.1 Glucocorticoides sintètics.....	42
1.3.2 Mecanisme d'acció .....	45
1.3.3 Ús mèdic de la betametasona .....	47
1.3.4 Efectes prenatals dels glucocorticoides.....	49
1.3.5 Efectes dels glucocorticoides en altres malalties immuno-mediades. ....	50
2. HIPÒTESI.....	55
3. OBJECTIUS.....	56
4. MATERIAL I MÈTODES.....	59
4.1 Reactius.....	59
4.2 Model experimental: Ratolí No Obès Diabètic (NOD) .....	59

<b>4.3</b>	<b>Determinació de la incidència de diabetis mellitus tipus 1.....</b>	<b>60</b>
<b>4.4</b>	<b>Teixits murins .....</b>	<b>61</b>
4.4.1	Melsa .....	61
4.4.2	Fèmur i tibia.....	61
4.4.3	Criopreservació de sèrum, pàncrees i timus .....	61
4.4.4	Illots pancreàtics.....	61
<b>4.5</b>	<b>Histologia de l'òrgan diana .....</b>	<b>62</b>
4.5.1	Tinció Hematoxilina/Eosina .....	62
4.5.2	Determinació del grau d'infiltració limfocitària dels illots.....	63
<b>4.6</b>	<b>Obtenció d'esplenòcits .....</b>	<b>63</b>
<b>4.7</b>	<b>Determinació de poblacions limfocitàries de ratolins nous .....</b>	<b>64</b>
<b>4.8</b>	<b>Determinació de les famílies V<math>\beta</math> del TCR .....</b>	<b>65</b>
<b>4.9</b>	<b>Assaig de toxicitat.....</b>	<b>66</b>
<b>4.10</b>	<b>Assaig de proliferació .....</b>	<b>67</b>
<b>4.11</b>	<b>Generació de cèl·lules dendrítiques .....</b>	<b>68</b>
<b>4.12</b>	<b>Anàlisi del fenotip de les cèl·lules dendrítiques .....</b>	<b>69</b>
<b>4.13</b>	<b>Assaig de proliferació induïda per les cèl·lules dendrítiques .....</b>	<b>70</b>
<b>4.14</b>	<b>Efectes de la betametasona sobre les cèl·lules <math>\beta</math> .....</b>	<b>71</b>
<b>4.15</b>	<b>ELISA.....</b>	<b>72</b>
<b>4.16</b>	<b>Extracció de RNA .....</b>	<b>73</b>
<b>4.17</b>	<b>RT-PCR en temps real .....</b>	<b>74</b>
<b>4.18</b>	<b>Mostres Humanes.....</b>	<b>76</b>
4.18.1	Assaig de toxicitat en PBMCs .....	76
4.18.2	Enquestes a mares sobre tractament prenatal amb betametasona i fills amb DT1 .....	78
<b>4.19</b>	<b>Anàlisi estadística .....</b>	<b>78</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTATS.....</b>	<b>81</b>
<b>5.1</b>	<b>Efectes de la betametasona en el model experimental.....</b>	<b>81</b>

5.1.1	La betametasona prenatal redueix la incidència de DT1.....	81
5.1.2	La betametasona afecta la infiltració leucocitària als illots pancreàtics. ....	82
5.1.3	La betametasona prenatal altera les subpoblacions leucocitàries a timus i melsa .....	84
5.1.4	La betametasona prenatal altera el repertori de TCR dels limfòcits T .....	91
<b>5.2</b>	<b>Efectes de la betametasona en cultius cel·lulars .....</b>	<b>93</b>
5.2.1	La betametasona redueix la viabilitat dels esplenòcits .....	93
5.2.2	La betametasona genera cèl·lules dendrítiques resistents a la maduració.....	94
5.2.3	La betametasona altera la secreció de citocines en les cèl·lules dendrítiques ...	98
5.2.4	La betametasona inhibeix la proliferació de limfòcits T CD3 $\gamma\delta$ i la seva capacitat de produir IL-17 .....	100
5.2.5	La betametasona indueix quiescència en la línia cel·lular NIT-1 .....	104
5.2.6	La betametasona altera el fenotip i la secreció d'insulina en la línia cel·lular NIT-1 .....	105
5.2.7	La betametasona modifica la transcripció gènica en la línia cel·lular NIT-1.....	107
5.2.8	Validació de la RT-PCR en pàncrees i illots murins .....	108
5.2.9	La betametasona altera l'expressió de gens que codifiquen molècules immunomoduladores en illots murins .....	111
<b>5.3</b>	<b>Aproximació indirecta dels efectes de la betametasona en humans .....</b>	<b>112</b>
5.3.1	La betametasona redueix la viabilitat de les cèl·lules mononuclears humanes de sang perifèrica .....	112
5.3.2	Avaluació epidemiològica preliminar de l'efecte de la betametasona prenatal en la incidència de DT1 a l'HUGTiP .....	113
<b>6.</b>	<b>DISCUSSIÓ.....</b>	<b>119</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>137</b>
<b>8.</b>	<b>ARTICLES.....</b>	<b>139</b>
<b>9.</b>	<b>ANNEX .....</b>	<b>173</b>
<b>10.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>175</b>
<b>11.</b>	<b>AGRAÏMENTS.....</b>	<b>205</b>



# Abreviatures

<b>11<math>\beta</math>-HSD1</b>	11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa isoforma 1
<b>11<math>\beta</math>-HSD2</b>	11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa isoforma 2
<b>7-AAD</b>	7-Aminoactinomicina
<b>AGM</b>	Aorta, gònades i mesonefre
<b>AnnV</b>	Annexina V
<b>APC</b>	Alo ficocianina
<b>APC-Cy7</b>	Alo ficocianina-cianina 7
<b>BCR</b>	Receptor de la cèl·lula B
<b>betDCs</b>	Cèl·lules dendrítiques diferenciades amb betametasona
<b>BV421</b>	Violeta brillant 421nm
<b>CD</b>	Marcadors de diferenciació cel·lular
<b>CD8ISP</b>	Limfòcit T immadur CD8 positiu
<b>cDNA</b>	Copia de l'àcid desoxiribonucleic
<b>CFDA-SE</b>	Carboxifluoresceïna di-acetat succinimidil ester
<b>CFSE</b>	Carboxifluoresceïna succinimidil ester
<b>CmH</b>	Cèl·lules mare hematopoètiques
<b>CPA</b>	Cèl·lula presentadora d'antigen
<b>d1</b>	Dia 1 post part
<b>d4</b>	Dia 4 post part
<b>DCs</b>	Cèl·lules dendrítiques
<b>DE</b>	Desviació estàndard
<b>DN</b>	Doble negativa
<b>DNA</b>	Àcid desoxiribonucleic
<b>DT1</b>	Diabetis mellitus tipus 1
<b>DP</b>	Doble positiva
<b>E</b>	Dia d'embriogènesis
<b>ERG</b>	Element de resposta a glucocorticoide
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FC</b>	<i>Fold change</i> o canvi d'increment
<b>FITC</b>	Fluoresceïna
<b>FMO</b>	Fluorescència menys un

## Abreviatures

---

<b>FT</b>	Factor de transcripció
<b>GAD</b>	Descarboxilasa de l'àcid glutàmic
<b>GADA</b>	Antigen de la descarboxilasa de l'àcid glutàmic
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags
<b>GWAS</b>	Estudi genètic d'associació global
<b>HIPs</b>	Pèptids híbrids d'insulina
<b>HLA</b>	Antigen leucocitari humà
<b>HPA</b>	Eix hipotalàmic-pituïtari-adrenal
<b>HRP</b>	Peroxidasa del rave
<b>HSP</b>	Proteïna de xoc tèrmic
<b>H/E</b>	Tinció d'hematoxilina/eosina
<b>IA2</b>	Antigen de l'illot 2
<b>IC50</b>	Concentració inhibidora 50
<b>iDCs</b>	Cèl·lules dendrítiques immadures
<b>IFN<math>\beta</math></b>	Interferó $\beta$
<b>IgM</b>	Immunoglobulina M
<b>IgG</b>	Immunoglobulina G
<b>IGTP</b>	Institut germans Trias i Pujol
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina-1 $\beta$
<b>IL-2</b>	Interleucina-2
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IL-10</b>	Interleucina-10
<b>IL-17</b>	Interleucina-17
<b>Illes CpG</b>	Illes de seqüències riques en citocines i guanines
<b>iNKT</b>	Cèl·lules T assassines naturals invariants
<b>IO</b>	Ionomicina
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>LPS</b>	Lipopolisacàrid
<b>LTIs</b>	Cèl·lules iniciadores de teixit limfoide
<b>MC</b>	Medi complet
<b>mDCs</b>	Cèl·lules dendrítiques madures
<b>MFI</b>	Mediana de la intensitat de fluorescència
<b>MHC</b>	Complex major d'histocompatibilitat
<b>MMLV</b>	Virus de la leucèmia del ratolí moloney
<b>MODY</b>	<i>Maturity onset of the young</i>
<b>mRNA</b>	Àcid ribonucleic missatger

<b>NK</b>	Cèl·lules assassines naturals ( <i>natural killer cells</i> )
<b>NOD</b>	Ratolí no obès diabètic ( <i>Non-Obese diabetic</i> )
<b>PBS</b>	Tampó fosfat salí
<b>PBMCs</b>	Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PE-Cy7</b>	Ficoeritrina-cianina 7
<b>PercP-Cy5.5</b>	Complex proteic de clorofil·la i peridina-Cianina 5.5
<b>PMA</b>	Forbol 12-miristat 13-acetat
<b>RG</b>	Receptor de Glucocorticoides
<b>RNA</b>	Àcid ribonucleic
<b>SBF</b>	Sèrum boví fetal
<b>SdH</b>	Solució d'hemòlisi
<b>SG</b>	Setmanes de gestació
<b>SNP</b>	Polimorfisme simple d'un nucleòtid
<b>SPF</b>	Establiment lliure de patògens específics
<b>TA</b>	Temperatura ambient
<b>TCR</b>	Receptor de la cèl·lula T
<b>TGFβ</b>	Factor de creixement de tumors β
<b>Th</b>	T d'ajuda
<b>Th1</b>	T d'ajuda 1
<b>Th2</b>	T d'ajuda 2
<b>Th17</b>	T d'ajuda 17
<b>TMB</b>	Tetrametil benzidina
<b>TNFα</b>	Factor de necrosi tumoral α
<b>Treg</b>	Limfòcits T reguladors
<b>Vβ</b>	Zona variable de la cadena β del receptor de cèl·lula T
<b>ZnT8</b>	Transportador de Zinc 8





# Resum

La incidència de diabetis mellitus tipus 1 (DT1) està augmentant en tot el món en els últims anys i la causa d'aquest fet segueix sent desconeguda. Els factors ambientals són crucials en el desenvolupament de la DT1, però fins ara no han sigut profundament estudiats durant l'època prenatal. Els dos actors principals de la DT1, el sistema immunitari i els illots pancreàtics, estan en desenvolupament fins a l'última setmana abans del naixement i poden ser fàcilment alterats utilitzant fàrmacs. En aquest sentit, els glucocorticoides sintètics tenen potents efectes antiinflamatoris i immunosupressors i poden travessar la barrera materno-fetal. Aquesta família de molècules interaccionen amb el receptor de glucocorticoides que s'expressa de forma ubiqua a totes les cèl·lules. La betametasona és un glucocorticoide administrat a dones amb risc de part prematur per a millorar la salut perinatal del nadó al naixement gràcies a estimular la maduració dels pulmons fetals. Actualment, al mateix nivell que augmenten els nadons prematurs, augmenta l'ús de la betametasona. La hipòtesi d'aquest treball és que la betametasona influeix en la incidència de la DT1, mitjançant modificacions en el desenvolupament del sistema immunitari prenatal i de la cèl·lula  $\beta$ . L'objectiu principal de l'estudi és determinar l'efecte de la betametasona prenatal sobre la susceptibilitat de desenvolupar DT1.

Es va realitzar un estudi d'incidència en el model experimental de DT1, el ratolí No-Obès Diabètic (NOD). La betametasona prenatal va reduir la incidència de DT1 en la descendència femella del grup tractat (22%) respecte a la incidència del grup control (75%), correlacionant amb una disminució dels limfòcits infiltrants a l'illot. Notablement, la betametasona va induir hipotròfia del timus i alteracions en les subpoblacions del sistema immune en els ratolins nounats. El repertori de famílies  $V\beta$  del TCR de limfòcits T es va determinar en ratolins de 6 setmanes d'edat i es va observar una reducció en la freqüència de les famílies de  $V\beta$  autoreactives. La betametasona va provocar un efecte tòxic en els limfòcits no estimulats del ratolí. En les cèl·lules dendrítiques, la betametasona va induir un estat de resistència a la maduració, fet que va comportar una reducció en la seva producció de citocines i va aturar la proliferació autòloga de limfòcits T  $\gamma\delta$  i la seva secreció d'IL-17. L'efecte de la betametasona en la cèl·lula  $\beta$  es va determinar en la línia cel·lular NIT-1 de ratolí NOD, en pàncrees i en illots purificats de ratolí NOD. La betametasona disminuí la viabilitat de les cèl·lules NIT-1, evitant la proliferació cel·lular i reduint la secreció d'insulina. A més, La betametasona va induir una disminució de la molècula CD44 i un increment de MHC de classe I a la membrana de les cèl·lules NIT-1. D'altra banda, la betametasona va alterar l'expressió gènica en la línia cel·lular NIT-1, en el

pàncrees i en els illots, afectant gens relacionats amb l'autoimmunitat, el metabolisme, la massa d'illots i inhibidors de la regulació immunitària. Per tal de realitzar una aproximació a l'efecte en humans, es va testar l'efecte de la betametasona en leucòcits humans. Es van utilitzar cèl·lules mononuclears de sang perifèrica i només es va observar un efecte tòxic en limfòcits B i monòcits. A més, dades epidemiològiques preliminars de pacients amb DT1 de l'HUGTiP apunten cap a l'efecte protector de la betametasona en el risc de desenvolupar DT1.

En conclusió, la betametasona protegeix contra la DT1 experimental mitjançant alteracions de la resposta immunitària i reduint el reconeixement autoimmune contra les cèl·lules  $\beta$ . Aquests resultats, juntament amb dades preliminars d'estudis en humans, recolzen l'efecte protector de la betametasona prenatal en el desenvolupament de la DT1.

# Summary

The incidence of type 1 diabetes (T1D) has been steadily increasing worldwide in the last years and the cause remains to be elucidated. Environmental factors are crucial in the pathogenesis of T1D, but these factors have not been studied thoroughly during the prenatal stage. The two actors in the development of T1D, the immune system and the pancreatic islets, are still developing until the last weeks before delivery and can be easily altered by drugs. In this sense, synthetic glucocorticoids have powerful anti-inflammatory and immunosuppressive effects and can cross the maternofoetal barrier. This family of drugs interacts with the ubiquitously expressed glucocorticoid receptor. Betamethasone is a glucocorticoid administered to women at risk of preterm delivery to improve perinatal outcome after birth by stimulating foetal lung maturation. At the same time that premature new-borns are increasing, the use of betamethasone is raising. The hypothesis of this work is that betamethasone may affect the development of foetal immune system and pancreas, thus influencing the risk of developing T1D in the offspring. The aim of this study was to determine the effect of prenatal betamethasone on T1D susceptibility.

An incidence study was performed in the experimental model of T1D, the non-obese diabetic (NOD) mice. Prenatal betamethasone administration caused a reduction in T1D incidence in the female offspring from the treated group (incidence of 22%) when compared to the sham group (incidence of 75%), correlating with a decrease in infiltrating lymphocytes in the islets. Remarkably, betamethasone caused thymus hypotrophy and alterations in immune cells subsets in new-born mice. The TCR  $V\beta$  T cell repertoire was assessed in 6 weeks-old mice and a clear decrease in the frequency of autoreactive  $V\beta$  families was found. Betamethasone caused in vitro toxicity to resting mouse lymphocytes. In dendritic cells, betamethasone induce a maturation-resistant status, thus decreasing their cytokine production and impairing autologous  $\gamma\delta$  T lymphocyte proliferation induction ability and secretion of IL-17. The effect of betamethasone on  $\beta$ -cells was determined in the NOD  $\beta$ -cell line NIT-1, in whole pancreas and in purified islets from NOD mice. Betamethasone effects were detrimental for NIT-1 cell viability, arresting cell growth and reducing insulin secretion. Downregulation of CD44 membrane expression and upregulation of MHC class I expression was induced by this glucocorticoid in NIT-1 cells. Betamethasone also altered gene expression in NIT-1 cell line, pancreas and islets, affecting genes related to autoimmunity, metabolism, islet mass and immune checkpoint inhibitors. In order to move forward, human peripheral blood

## Summary

---

mononuclear cells were used to determine betamethasone effects. A toxic effect was observed only in monocytes and B cells. Moreover, preliminary epidemiological data from paediatric patients with T1D from the Germans Trias i Pujol Hospital reinforces the putative the protective effect of betamethasone in the risk of developing T1D.

In conclusion, betamethasone has a protective effect against experimental T1D by altering the immune system response and potentially decreasing autoimmune recognition of  $\beta$ -cells. These results, together with our preliminary data from human studies, support a protective effect of prenatal betamethasone in T1D development.

---

---

# *Introducció*

---

---



# 1. Introducció

La medicina i la ciència han aconseguit curar una gran quantitat de malalties en tota la seva història, però encara hi ha malalties que presenten una dificultat extrema per trobar-ne la cura. Les malalties autoimmunitàries es troben dins aquest grup. La complexitat i l'heterogeneïtat d'aquest tipus de malalties són uns dels problemes cabdals a l'hora d'aconseguir la remissió total. Un bon primer pas per a combatre-les és conèixer els seus orígens, saber quin és el punt crític que desencadena tots els esdeveniments que portaran fins a la malaltia. En el cas de la diabetis mellitus tipus 1 (DT1), aquest punt crític es desconeix i, tot i que moltes línies de recerca intenten descobrir quin és el causant de l'autoimmunitat, no s'ha arribat a cap consens. Però poc a poc, anem reconstruint l'escena buscant la clau mestra de la DT1. En aquest estudi revisem com l'efecte d'un fàrmac, en aquest cas la betametasona, pot modificar el sistema immunitari i el pàncrees fetal provocant canvis de llarga durada que afectarien la susceptibilitat a patir DT1.

## 1.1 La diabetis mellitus tipus 1

### 1.1.1 Història natural de la malaltia i patogènesi

La DT1 és una malaltia autoimmunitària provocada per l'atac del sistema immunitari contra les cèl·lules productores d'insulina, les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques dels illots de Langerhans. Aquest atac acabarà per destruir gran part de la massa de cèl·lula  $\beta$  en el pàncrees, impossibilitant el correcte control metabòlic de la glucèmia en sang i obligant a l'administració exògena d'insulina per tal de mantenir una glucèmia normal.

El pacient amb DT1 al moment del diagnòstic es caracteritza per presentar uns elevats nivells de glucosa en sang ( $>200\text{mg/dL}$  o  $>126\text{mg/dL}$  en dejuni), juntament amb símptomes com la poliúria (abundant micció), la polidípsia (sensació continua de sed), pèrdua de pes i, en un terç dels pacients, cetoacidosis. En adults és possible que no es presentin alguns d'aquests símptomes més típics. Es calcula que almenys el 50% dels nous casos de DT1 són pacients pediàtrics (Thomas et al., 2018).

Tot i que les cèl·lules responsables de l'atac autoimmunitari estan molt ben caracteritzades, encara és difícil identificar quin és el causant en casos individuals. Una combinació de factors genètics i ambientals podrien explicar l'inici de la malaltia, però l'heterogeneïtat en aquests factors en molts pacients dificulta enormement la identificació d'un factor causal comú entre tots els casos de DT1.



### 1.1.1.1 Factors genètics

El principal factor genètic de susceptibilitat és l'haplotip de l'antigen leucocitari humà (HLA), sent el HLA-DR3/DQ2 i el HLA-DR4/DQ8 els dos haplotips que més predisposició a la DT1 confereixen (Pociot and Lernmark, 2016). De fet, fins a un 90% dels casos de DT1 a Finlàndia tenen un dels dos haplotips (Graham et al., 2002). Aquests haplotips no són els únics factors genètics relacionat amb la DT1 però si que acumulen el 50% del risc genètic. La presència d'aquests haplotips predisposa a l'aparició del primer autoanticòs contra la insulina (HLA-DR4/DQ8) (Ilonen et al., 2013; Krischer et al., 2015; Ziegler et al., 1991) o contra la descarboxilasa de l'àcid glutàmic (GADA, HLA-DR3/DQ2) (Ilonen et al., 2013; Krischer et al., 2015), rarament el primer autoanticòs contra l'illot serà el de l'antigen de l'illot 2 (IA2) o el canal transportador de zinc 8 (Znt8) (Krischer et al., 2015). Després de generar-se el primer autoanticòs, els següents no solen tenir un ordre establert, però a major número d'anticòsos contra antigens de l'illot, més probable és l'aparició de la DT1. Fins a un 80% de les persones amb 2 anticòsos acabarà desenvolupant una DT1 en 20 anys (Ziegler et al., 2013). A més, molts estudis genètics d'associació global (GWAS) han revelat la possible implicació d'altres gens en el desenvolupament de la DT1 (Bradfield et al., 2011; Cooper et al., 2008). Aquests possibles gens candidats són la *IL27*, *BAD*, *CD69*, *PRKCQ*, *CLEC16A*, *ERBB3* i *CTSH* (Pociot and Lernmark, 2016). Tots ells estan implicats en diferents processos tant de la cèl·lula  $\beta$  com del sistema immunitari i s'han trobat polimorfismes d'un nucleòtid simple (SNP) que podrien estar augmentant el risc. Encara es necessiten més estudis per a confirmar la validesa d'aquest SNP com a marcadors, ja que amb l'abaratiment de la determinació del perfil genètic dels pacients, la creació d'una puntuació de risc genètic serviria per a identificar de forma més precisa aquelles persones amb un major risc de desenvolupar una DT1, millorant l'actual identificació basada en l'haplotip del HLA.

Al mateix temps, també trobem altres haplotips com el HLA-DR15/DQ6 que confereixen protecció (DiMeglio et al., 2018). Relacionat amb la genètica trobem un tipus de diabetis mellitus no autoimmunitària causada per mutacions puntuals en un únic gen. Aquestes diabetis mellitus monogèniques són anomenades *maturity onset diabetes of the Young* (MODY) i es caracteritzen per tenir una herència genètica autosòmica dominant. Fins avui s'han descrit fins a 9 tipus diferents de MODY afectant diferents nivells de la diferenciació de la cèl·lula  $\beta$ , de la producció de la insulina o de la detecció de la glucèmia. Aproximadament entre 1-6% dels casos de diabetis pediàtriques són de tipus MODY i més del 90% de les diabetis pediàtriques són DT1 (Delvecchio et al., 2017).

### 1.1.1.2 Factors Ambientals

Tot i que els factors genètics són importants, estan lluny d'explicar les causes de la DT1, ja que en germans amb el mateix genoma (bessons univitel·lins) la concordança és només del 50% (Kumar et al., 1993). Així, els factors ambientals tenen un paper clau en el desenvolupament de la DT1. Dintre dels factors ambientals que podrien estar augmentant la susceptibilitat o desencadenant la DT1, es troben:

#### ❖ **La dieta.**

Sobretot en els primers anys de vida, la dieta sembla contribuir al risc de desenvolupar DT1 i tot i que molts dels estudis segueixen en curs, la introducció primerenca de certs aliments com la llet de vaca (Lamb et al., 2015; Virtanen et al., 2012; Wahlberg et al., 2006), els cereals (Norris et al., 2003), especialment aquells que contenen gluten (Wahlberg et al., 2006; Ziegler et al., 2003), o la introducció de tubercles abans dels 4 mesos o ous abans dels 8 mesos (Virtanen et al., 2011) poden augmentar el risc d'autoimmunitat contra l'illot. Aquests estudis solen ser difícils d'interpretar i s'ha de vigilar amb les conclusions que se n'obtenen. Per exemple, en el cas del gluten, la cohort de l'estudi TEDDY (*The Environmental Determinants of Diabetes in the Young*) demostra que l'exposició tardana al gluten incrementa l'autoimmunitat a l'illot (Uusitalo et al., 2018), justament al contrari del que postula la cohort de l'estudi BABYDIAB (Ziegler et al., 2003) on veuen que la ingesta de gluten abans dels 3 mesos augmenta molt l'autoimmunitat contra l'illot, però no veuen efecte a partir dels 6 mesos d'edat. Per altra banda, sembla que l'al·letament matern durant la introducció dels cereals protegeix en front la DT1 (Frederiksen et al., 2013).

#### ❖ **La vitamina D.**

S'associa amb un possible efecte protector gràcies a la seva capacitat de regular el sistema immune, sobretot per la repressió sobre la resposta immune dels limfòcits T d'ajuda 1 (Th1) i per la generació de cèl·lules presentadores d'antigen (CPA) i macròfags de caràcter antiinflamatori. Per tant, una absència de vitamina D podria ser fatal per a mantenir la homeòstasi del sistema immune. Si que s'ha observat que polimorfismes en els gens relacionats amb la vitamina D incrementen el risc de desenvolupar una DT1 (Infante et al., 2019). Tot i això, pocs estudis aconseguen demostrar que la ingesta suplementària de vitamina D directament pel nen o indirectament per la mare durant l'embaràs redueixi la incidència de DT1 (Infante et al., 2019; Rosenbauer et al., 2008; Simpson et al., 2011).

#### ❖ **Les infeccions víriques.**

Especialment, les infeccions causades per la família dels enterovirus, presenten una forta evidència com a factor de risc al desenvolupament de la DT1, tant en models animals com en humans (Richardson and Morgan, 2018). Els enterovirus tenen

tropisme pels illots pancreàtics i a més, aquest virus s'han detectat en el pàncrees de pacients amb DT1 en el diagnòstic clínic (Krogvold et al., 2015; Yeung et al., 2011). També, infeccions d'enterovirus en l'embaràs poden desencadenar una reacció autoimmunitària contra els illots tant a la mare com al nadó (Viskari et al., 2012). Una altra família de virus relacionada amb la DT1 són els rotavirus. De forma indirecta s'ha observat en una gran cohort australiana una disminució en els casos de DT1 entre el 0-4 anys després la utilització d'una vacuna oral contra els rotavirus (Perrett et al., 2019). En canvi, un estudi similar però amb una cohort molt més reduïda a Finlàndia no troba una forta associació entre la vacunació i la disminució de DT1 (Vaarala et al., 2017). En conclusió, tot i que l'efecte dels virus sembla clar, no és present en el 100% dels casos de DT1 i dependrà de la zona geogràfica la seva aportació a nous casos de DT1

### ❖ La hipòtesi de la higiene.

La hipòtesi de la higiene proposa que l'augment de la DT1 es dona a causa de la millora de la higiene i en conseqüència a la reducció de les infeccions en els primers mesos de vida. En dues poblacions genèticament molt similars (Finlàndia i una zona fronterera amb Rússia) es va trobar que les diferències en l'estil de vida, sobretot en la higiene i el nombre d'infeccions durant la infància, provoca alteracions en la incidència d'al·lèrgies i malalties autoimmunitàries (Kondrashova et al., 2013). Estudis en animals veuen un efecte similar, on la utilització de patògens redueix la incidència de DT1 en el model experimental (Tracy et al., 2002; Zaccone et al., 2009). Tot i ser una hipòtesi interessant, els estudis prospectius en humans no li acaben de donar suport, ja que molts d'ells no troben relació en la falta d'infeccions amb l'autoimmunitat a l'illot, més aviat tot al contrari (Beyerlein et al., 2014; Cardwell et al., 2008; Rasmussen et al., 2011; Rewers and Ludvigsson, 2016). Sabent això, és possible que aquesta millora en la higiene repercuteixi en menys infeccions per enterovirus durant la infantesa i això provocarà una capacitat disminuïda de reacció contra aquests virus. Per tant, el sistema immunitari no estarà tant preparat per combatre el virus. Aquesta immunitat reduïda contra els virus, farà que les dones embarassades no neutralitzin eficientment el virus exposant els fetus a infeccions per enterovirus (Elfving et al., 2008; Viskari et al., 2005) que poden desencadenar una autoimmunitat contra els illots en el fetus.

### ❖ La microbiota.

La microbiota intestinal és el conjunt de microorganismes bacterians que conformen la flora intestinal del cós humà. En DT1 és un factor que ha anat guanyant rellevància en els últims anys, ja que aquest complex sistema de microorganismes és important tant pel metabolisme dels glúcids com dels lípids, així com per la immunitat i la inflamació. És possible que la microbiota pugui modular el risc de desenvolupar una DT1. Alguns estudis han demostrat subtils canvis en la diversitat

de la microbiota de nens que desenvoluparan una DT1 comparat amb nens que no desenvoluparan DT1 (Kostic et al., 2015; Stewart et al., 2018; Vatanen et al., 2018). La microbiota està formada per un delicat equilibri de les diferents espècies que la componen. Quan un d'aquest bacteris prolifera més agressivament que els altres, l'equilibri es trenca i la diversitat es redueix. Aquest microorganisme predominant capta els recursos de les altres espècies i aquest fet altera el correcte funcionament de la microbiota i promou la DT1. Tot i això, seria indicat expandir més els estudis sobre microbioma, sobretot en la fase anterior al diagnòstic de la DT1, ja que canvis en aquesta fase podrien ser un dels desencadenants més importants de la DT1. D'altra banda, cal destacar que metabòlits provinents de la fermentació de la microbiota són capaços de prevenir la DT1 en el ratolí No Obès Diabètic (NOD) (Mariño et al., 2017).

#### ❖ **Les toxines i compostos químics.**

Aquest compostos podrien ser possibles activadors dels mecanismes autoimmunes en individus genèticament susceptibles. Tenim una gran quantitat de candidats però les evidències del seu possible efecte encara són molt preliminars. Així i tot, sí que s'ha demostrat l'efecte de certs compostos químics com el bisfenol A, que modifica la capacitat de secreció d'insulina per part de les cèl·lules  $\beta$  (García-Arévalo et al., 2016; Stahlhut et al., 2018) en l'àmbit de la diabetis mellitus tipus 2 i per tant potser també podria influir en el desenvolupament de la DT1, en modificar la cèl·lula diana.

Tot plegat, els factors mencionats i d'altres tenen un impacte sobre l'estrès de la cèl·lula  $\beta$ . Aquest estrès podria augmentar la inflamació i el risc d'autoimmunitat contra l'illot a causa de la major apoptosi que sofrirà la cèl·lula  $\beta$  (Vives-Pi et al., 2015). Altres possibles fonts d'estrès per la cèl·lula  $\beta$  serien un creixement accelerat, el sobrepès o la pubertat (Lamb et al., 2008); fins i tot l'estrès psicològic pot augmentar la resistència a la insulina i influenciar la resposta immune a través dels glucocorticoides com el cortisol (Rewers and Ludvigsson, 2016). En resum, l'estrès en el reticle endoplasmàtic de forma continuada altera la producció d'insulina i contribueix a l'apoptosi de les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques. Aquest estrès fa augmentar el número de modificacions post translacionals en les proteïnes de la cèl·lula  $\beta$  i aquestes modificacions poden comportar la creació de neoantígens. Els neoantígens estan compostos principalment per la fusió de 2 proteïnes formant un pèptid híbrid d'insulina (HIPs), generalment units a la cromogranina A o al polipèptid amiloide de l'illot. S'han trobat limfòcits T CD4 reactius contra el HIPs en pacients amb DT1, així que la generació d'aquests neoantígens podria ser un mecanisme de pèrdua de la tolerància pròpia en la DT1 (Delong et al., 2016; Jin et al., 2015a).

En conclusió, la DT1 presenta una gran heterogeneïtat pel que fa a possibles causes del desenvolupament de l'atac autoimmunitari. Aquest fet dificulta molt la

identificació de les causes de la malaltia, encara que el punt final és el mateix per a tothom: l'activació del sistema immune i l'atac contra les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques.

### *1.1.1.3 Patogènesi*

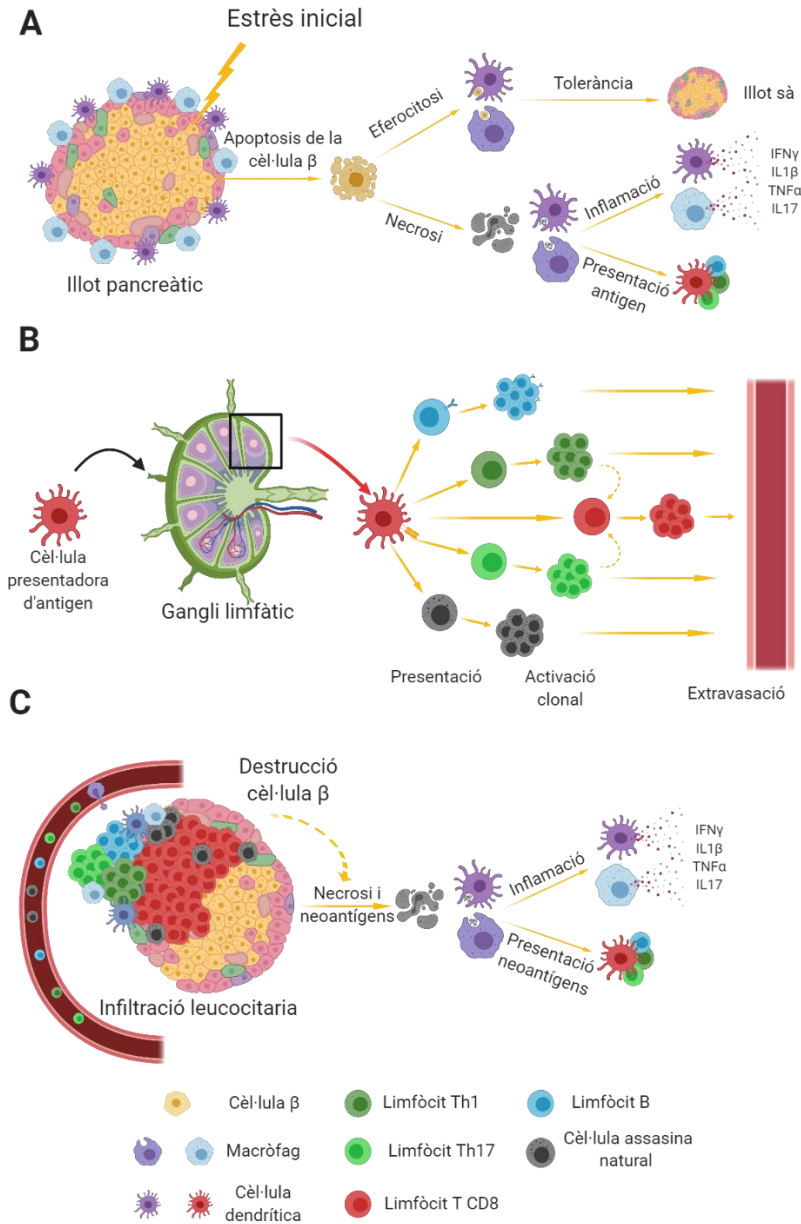
Dins dels principals factors que poden desencadenar l'autoimmunitat, destaquen diferents cèl·lules del sistema immunitari implicades en el desenvolupament i exacerbació d'aquesta resposta contra els òrgans propis. Conèixer aquestes cèl·lules i la seva funció és un punt clau en l'estudi de la DT1.

Per tal d'arribar a la destrucció de les cèl·lules  $\beta$  per part dels limfòcits T CD8 citotòxics, que són els principals causants de la destrucció del pàncrees endocrí, tant la immunitat adaptativa com la immunitat innata hauran de ser activades. Primerament, els fagòcits de la immunitat innata capturaran tant cossos apoptòtics com cèl·lules necròtiques provinents de la cèl·lula  $\beta$ . Els cossos apoptòtics provenen d'un procés fisiològic de mort programada on s'evita l'alliberació del contingut del citoplasma a l'espai extracel·lular ja que es manté la integritat de la membrana. Les cèl·lules necròtiques, en canvi, provenen de processos de lisi cel·lular on és perdrà la integritat de la membrana i s'alliberà el contingut del citoplasma a l'espai extracel·lular, promovent un ambient proinflamatori (Kimani et al., 2014; Krysko et al., 2006; Vives-Pi et al., 2015). A més, si hi ha deficiències en l'eliminació dels cossos apoptòtics, aquests perdran la integritat de la membrana i faran el mateix efecte que una cèl·lula necròtica (O'Brien et al., 2006). Si es capturen cossos apoptòtics, el sistema immunitari crearà una resposta tolerogènica davant aquells antígens i mantindrà la homeòstasis del pàncrees. En canvi, la captura de cèl·lules necròtiques no induirà una resposta protectora sinó al contrari. La fagocitació i eliminació d'aquestes cèl·lules necròtiques provocarà que s'iniciï un procés d'inflamació en els illots del pàncrees. Aquest procés atraurà més cèl·lules del sistema immune, com les cèl·lules dendrítiques (DCs), principals encarregades de processar i presentar els antígens als limfòcits T i B en un ambient inflamatori (Szablewski, 2014). Les DCs maduraran i respondran a l'autoantigen com a un element perillós. A continuació, les DCs migraran cap als ganglis limfàtics per tal de presentar l'antigen i reclutar limfòcits específics contra aquest antigen. Les DCs activaran els limfòcits T CD4 i juntament amb aquests induiran l'activació dels limfòcits T CD8 citotòxics amb afinitat contra la insulina (Haque et al., 2017). Aquesta proteïna intracel·lular serà presentada mitjançant el complex major d'histocompatibilitat (MHC) classe I. El limfòcits T CD8 són els principals responsables d'eliminar les cèl·lules que puguin estar contaminades per un virus o, en aquest cas, les cèl·lules que produeixin insulina. En teoria, si la selecció tímica funcionés a la perfecció, les DCs no haurien de trobar cap limfòcit amb la suficient afinitat contra l'autoantigen per a reaccionar i començar la proliferació (Bulek et al., 2012; Mannering et al., 2004). Per desgràcia, això no és així, ja que hi ha un baix percentatge de limfòcits autoreactius amb baixa

afinitat en sang perifèrica. Al final aquesta sèrie d'errors acaba desencadenant l'activació de limfòcits T CD8 citotòxics amb tropisme per la cèl·lula  $\beta$ , que viatjaran fins al pàncrees on realitzaran la seva funció, infiltrant i destruint sistemàticament les cèl·lules  $\beta$  del pàncrees. Aquesta segona onada de mort cel·lular exacerbarà encara més l'atac autoimmune contra les cèl·lules  $\beta$ , creant un cercle de destrucció i activació del sistema immune (Atkinson et al., 2014; DiMeglio et al., 2018). Fins avui en dia, aquest mecanisme sembla el més probable en l'establiment de la DT1.

Sabent això podem dividir la DT1 en vàries etapes:

**Punt d'inflexió i inflamació inicial:** Un dels punts més interessants en el desenvolupament de la DT1 és conèixer l'insult inicial que precipita tots els esdeveniments que conformen la malaltia. Com ja hem vist, la genètica només influeix en la susceptibilitat de la malaltia i per tant segueix sent necessari un factor ambiental, una petita guspira que encengui les flames, perquè comenci l'autoimmunitat. En alguns casos tenim una relació bastant directe com podria ser la infecció d'un enterovirus en la cèl·lula  $\beta$  (Krogvold et al., 2015; Richardson and Morgan, 2018), proporcionant les condicions òptimes per l'inici de l'autoimmunitat en aquelles persones més susceptibles. D'altra banda, la majoria de factors són insults subtils i perllongats en el temps, com serien canvis en el microbioma, la dieta i l'exposició a certs químics o fàrmacs, tal com s'ha mencionat anteriorment. Una de les dificultats de conèixer aquest problema inicial radica en la inaccessibilitat de l'òrgan diana, el pàncrees, a causa dels elevats riscos que comporta fer una biòpsia d'aquest teixit. D'alguna forma o altra, el que es tindrà serà una condició fora del normal, fet que repercutirà en la cèl·lula  $\beta$  perquè haurà d'augmentar la producció d'insulina o estarà en un ambient més inflamatori, de manera que l'estrès que sofrirà la cèl·lula serà major del que hauria i al final la cèl·lula  $\beta$  acabarà activant les rutes d'apoptosis (Atkinson et al., 2011). Fins aquí, s'ha estat parlant de l'estat fisiològic normal per a moltes persones. Llavors, quina és la diferència amb les persones amb DT1? Principalment, la falta d'una correcta regulació de la tolerància, a causa de l'ambient proinflamatori en els illots. Això provocarà que les cèl·lules encarregades d'eliminar les restes cel·lulars, els fagòcits, començaran a produir citocines proinflamatòries per a reclutar més cèl·lules innates. En aquesta fase els principals responsables de fagocitar la seran neutròfils, macròfags i DCs (Figura 1A). Alhora seran els principals responsables d'iniciar l'atac autoimmune contra la cèl·lula  $\beta$  i l'activació dels limfòcits T CD4 i CD8 (Sun et al., 2015)



**Figura 1. Generació i manteniment de l'atac autoimmunitari als illots pancreàtics.** **A)** Inflamació inicial: macròfags i cèl·lules dendrítiques fagociten les cèl·lules necròtiques induint un procés inflamatori. **B)** Les cèl·lules dendrítiques que capturen antigen viatjaran fins al gangli per presentar l'antigen als limfòcits T i B i induir la seva expansió clonal. Aquest limfòcits extravassaran al torrent sanguini per dirigir-se als illots pancreàtics. **C)** Les cèl·lules activades infiltraran l'illot i atacaran la cèl·lula beta, produint més cèl·lules necròtiques i neoantígens que mantindran l'ambient inflamatori i l'atac contra els illots pancreàtics. Figura creada amb **Biorender.com**

**Reconeixement i activació:** Les DCs seran les encarregades, un cop han fagocitat els cossos apoptòtics, de migrar fins als ganglis limfàtics per iniciar la resposta

adaptativa. Durant el viatge fins al gangli les DCs processaran totes les proteïnes fagocitades a l'illot pancreàtic utilitzant l'immunoproteosoma per tal de generar els diferents antígens a presentar (McCarthy and Weinberg, 2015). Típicament, seran carregats a dins les molècules de MHC classe I, però pot succeir fenòmens de presentació creuada i acabar alguns pèptids carregats a MHC classe II (Dudek and Purcell, 2014). Al gangli, presentaran els pèptids fins a trobar un limfòcit T amb afinitat per l'antigen. En aquest punt la presència d'un HLA de risc influirà en la facilitat de trobar limfòcits T autoreactius. De fet, en NOD s'ha observat que certs receptors de la cèl·lula T (TCR) tenen major afinitat per antígens coneguts de la T1D en el model animal, (Marrero et al., 2013, 2016; Toivonen et al., 2015) fet que augmenta la susceptibilitat contra la DT1. A causa del fet que aquestes DCs han madurat en un ambient proinflamatori -amb interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) o el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ),- presentaran una alta expressió de molècules de coestimulació com CD40 o CD80/86 (Creusot et al., 2018). Això induirà la presentació antigènica complerta i l'expansió clonal d'aquests limfòcits (Figura 1B). L'activació serà similar a la que es produiria per una infecció vírica. A més a més, les DCs no només activaran limfòcits T citotòxics, sinó que també promouran l'activació de limfòcits Th1 i T d'ajuda 17 (Th17) (Arif et al., 2011; Kumar and Subramaniyam, 2015), juntament amb limfòcits B, que ajudaran a mantenir, mitjançant l'alliberació de citocines, de forma prolongada l'acció de les cèl·lules citotòxiques en el pàncrees.

**Atac i manteniment de l'autoimmunitat:** Un cop la resposta adaptativa està activada començarà l'etapa més crítica en l'atac, en la que tots els limfòcits activats contra autoantígens de la cèl·lula  $\beta$  es dirigiran al pàncrees, on s'iniciarà l'atac contra les cèl·lules  $\beta$  que presentin mitjançant molècules de MHC classe I algun d'aquests autoantígens, s'ha observat que els illots de pacients amb DT1 sobre expressen molècules de MHC classe I (Kay et al., 1991; Richardson et al., 2016). Les cèl·lules més agressives i en major quantitat durant l'atac seran els limfòcits T CD8 (Coppieters et al., 2012), que mitjançant mecanismes de citotoxicitat de contacte directe com la perforina, la granzima B o la interacció de les molècules Fas-Fas lligant que destruiran específicament les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques induint la mort cel·lular (Knight et al., 2013). Però, no només els limfòcits T CD8 citotòxics s'infiltraran al pàncrees, sinó que limfòcits T CD4, limfòcits B, cèl·lules assassines naturals (NK), macròfags i cèl·lules iniciadores de teixit limfoide (LTIs), entre altres, també formaran part de l'infiltrat leucocitari (Wållberg and Cooke, 2013). Aquestes cèl·lules, més especialitzades en la secreció de citocines, promouran un ambient inflamatori amb presència d'espècies reactives d'oxigen i d'òxid nítric que facilitarà l'apoptosi i la mort de les cèl·lules  $\beta$  (Cardozo et al., 2005). Al mateix temps, poden aparèixer òrgans limfoides terciaris específics de teixit que permetran el reclutament, el manteniment i l'activació de noves cèl·lules amb capacitat citotòxica, reduint d'aquesta forma el temps de resposta del sistema immunitari



contra les cèl·lules  $\beta$  i transformant la resposta en un atac local. A més, la generació de neoantígens a causa de les HIPs facilitarà l'arribada de nous limfòcits autoreactius, ja que aquests antígens no poden ser seleccionats durant la maduració dels limfòcits T al timus (Pugliese, 2017). Aquesta fase, molt difícil d'identificar, pot allargar-se anys abans que es manifestin símptomes clínics en el pacient, però es calcula que un  $> 50\%$  de la massa  $\beta$  és destruïda abans que comencin els primers símptomes (Chmelova et al., 2015; Leete et al., 2016) (Figura 1C).

### 1.1.2 Evolució de la incidència

La incidència de la DT1 està augmentant en els darrers 20 anys, efecte impossible d'explicar només pels factors genètics. L'increment anual registrat és d'un 3-4% (Mayer-Davis et al., 2017; Tuomilehto, 2013), sent la població pediàtrica la més afectada. A més, depenent de l'àrea geogràfica el grup d'edat que augmenta la seva incidència variarà entre els 0-4 anys (Bruno et al., 2013; Karvonen, 2006), els 5-9 anys (Blumenfeld et al., 2014; Shaltout et al., 2017) o els 10-14 anys (Gomez-Diaz et al., 2012; Manuwald et al., 2017). Encara que l'edat amb major risc de desenvolupar DT1 és entre els 10-14 anys (Karvonen, 2006), es preocupant l'increment en la incidència de DT1 entre els 0-9 anys. Nous estudis identifiquen que desenvolupar DT1 abans dels 7 anys és degut a un atac autoimmunitari més agressiu contra les cèl·lules  $\beta$  amb una destrucció accelerada de l'illot pancreàtic (Leete et al., 2016).

Fora de la població pediàtrica també s'observa un increment en la incidència de DT1 en majors de 15 anys en diferents països com Regne Unit (Imkampe and Gulliford, 2011), Mèxic (Gomez-Diaz et al., 2012), Israel (Blumenfeld et al., 2014) i els Estats Units d'Amèrica (Lawrence et al., 2014). El fet que aquest increment no estigui focalitzat en un rang d'edat indica que tenim més d'un factor ambiental influenciant en l'increment de la incidència de DT1, fet que encara complica més la determinació d'un possible factor ambiental clau en aquesta tendència a l'alça.

Una observació important és que els països amb major incidència de DT1, l'increment ha sigut mínim en els últims estudis, com Finlàndia, Suècia, Itàlia, Irlanda, Espanya i Aràbia Saudí, que presenten una estabilització de la incidència de la DT1. Així, aquest increment anual és provocat per l'aparició de nous casos en països amb moderada o baixa incidència, sobretot de Sud-Amèrica, Àfrica i Àsia (Xia et al., 2019). Un dels possibles motius per l'augment en aquests països amb pocs recursos és la millora en la detecció i la diagnosi de la DT1, juntament amb una millora en els registres. Aquests països presenten una mitja de 5% d'increment per any, arribant al cas extrem de Xangai on la incidència augmenta fins a un 10% per any. Tot i que la incidència segueix sent molt baixa en molts d'aquests països, (no superen la incidència de 10) és un clar indicador de com els factors ambientals

afecten poblacions amb un rerefons genètic amb poca predisposició al desenvolupament de la DT1 i indueixen un augment d'aquesta malaltia (Xia et al., 2019). Un altre exemple de la importància dels factors ambientals són la descendència d'immigrants en països amb alta incidència com Suècia i Finlàndia. S'ha observat que augmenta la incidència de DT1 dels emigrants respecte al seu país d'origen (Söderström et al., 2012), tot i que la incidència dels emigrants no supera la incidència dels autòctons, excepte la descendència d'Africans de l'est nascuts a Finlàndia, que presenten una incidència superior a la dels finlandesos nascuts a Finlàndia (Hussen et al., 2013).

Vista la tendència en la incidència de la DT1 serà clau conèixer els factors ambientals i aprendre a com reduir la seva influència, sense oblidar-nos que encara queden molts possibles factors ambientals per identificar que podrien estar afectant la DT1 i que no han estat identificats, com l'exemple dels tractaments prenatals.

### 1.1.3 Incidència entre familiars

Una de les evidències més clares del fet que l'ambient uterí i el desenvolupament del sistema immunitari són punts claus en l'aparició de la DT1 són les diferències entre la incidència dels germans. En bessons genèticament idèntics, el risc de que el segon bessó desenvolupi una DT1 si el primer té una DT1 és d'aproximadament el 50%. En canvi entre germans, el risc es situa entre el 5-8% quant un dels dos germans té DT1 (Harjutsalo et al., 2005; Pociot and Lernmark, 2016). Aquesta incidència és molt similar a la que trobem quant un dels progenitors té DT1, tot i que el risc és més elevat quant el pare té DT1 (5-8%), mentre que quan és la mare el risc és menor (3-5%) (Harjutsalo et al., 2006; Pociot and Lernmark, 2016). A més, en els homes s'observa un efecte dependent de l'edat d'inici clínic de la DT1 que afectarà el risc de desenvolupar DT1 en la descendència. Si l'inici clínic de la DT1 va ser abans dels 4 anys, la incidència en la descendència augmenta fins a l'11%. D'igual manera, si l'inici clínic és passat els 20 anys, la incidència en la descendència és del 4% (Harjutsalo et al., 2010). En dones no s'aprecia un efecte a causa de l'edat d'inici clínic de la DT1.

Aprofundint més en el tema, el risc de desenvolupar DT1 en bessons variarà segons la genètica. Generalment, els bessons (siguin monozigòtics o dizigòtics) tenen major risc a desenvolupar DT1 si un dels bessons desenvolupa una DT1. Els que tenen major probabilitat són els bessons monozigòtics ja que en compartir major càrrega genètica augmenta el risc en aquest grup de població, arribant fins a un 65% d'incidència al cap de 60 anys de l'inici clínic d'un dels germans (Redondo et al., 2008). En general, els valors d'incidència entre bessons monozigòtics varien entre el 30-65% dependent de la població d'estudi i de la durada del seguiment (Hyttinen et al., 2003; Kumar et al., 1993; Nisticò et al., 2012; Redondo et al., 2001, 2008). En

canvi, en bessons dizigòtics tot i tenir una genètica més similar a germans de diferents embarassos, s'ha observat una risc augmentat, entre un 10-25% d'incidència en algunes cohorts d'estudi (Kumar et al., 1993; Kyvik et al., 1995; Nisticò et al., 2012). En altres cohorts la incidència és similar (5-8%) a la trobada en germans no genèticament relacionats (Hyttinen et al., 2003; Matsudaa and Kuzuya, 1994; Redondo et al., 1999). A més, s'ha demostrat que l'edat d'inici clínic del primer germà és rellevant en el risc de desenvolupar DT1 del segon germà, augmentant si el primer germà es diagnostica abans dels 10 anys (Hyttinen et al., 2003).

Aquestes dades i el fet que només el 40% d'aquestes diferències estan explicades sota una base genètica (Nisticò et al., 2012) ens fa pensar que compartir el mateix ambient uterí, pot influenciar la incidència de DT1. Evidentment, l'estrès sofert per la mare en embarassos dobles és molt major que en embarassos d'un sol nadó i això farà que l'ambient uterí canviï depenent del tipus d'embaràs i dels canvis provocats per agents externs, que també podrien modificar la incidència de DT1

### 1.1.4 Models experimentals: el ratolí no obès diabètic

Els models experimentals més utilitzats per a l'estudi de la DT1 són els ratolins. La utilització d'aquesta espècie ha permès l'obtenció de coneixements claus de l'òrgan diana que han facilitat el posterior estudi en humans. L'etapa embrionària és un punt important d'estudi tant en el ratolí com en humans. L'estudi del desenvolupament del sistema immunitari i del pàncrees són factors claus en la posterior aparició de malalties a l'edat adulta.

El ratolí NOD és un model experimental que desenvolupa de forma espontània una DT1 similar a la humana. Aquest ratolí va ser establert com a soca (ratolins genèticament iguals) per Makino i els seus col·laboradors (Makino et al., 1980), com a model de DT1 espontània i s'ha convertit en un dels models més utilitzat per a l'estudi de la DT1 arreu del món. Aquesta soca presenta un MHC classe II molt característic (H2-Ag7) (Koide et al., 1994) que li confereix una major susceptibilitat a patir la malaltia (Hattori et al., 1986). La utilització d'aquest model ens permet treballar amb un fons genètic molt similar als humans portadors dels gens HLA de risc com el DR3/DR4, però en ser una població tan homogènia dificulta la translació de coneixements a un grup genèticament heterogeni com són els humans. A més, el model NOD també es veu influenciat per factors ambientals en el desenvolupament de la DT1. Així, la temperatura o les condicions d'estabulació poden fer variar la incidència de DT1 (Alam et al., 2011; Williams et al., 1990). A més, s'ha demostrat que mantenir els ratolins NOD en condicions lliures de patògens específics (SPF) evita la maduració correcta del sistema immune en aquest model animal, fent que la seva susceptibilitat a la DT1 sigui encara major (Beura et al., 2016).

Aquest model experimental també presenta un clar component hormonal, ja que la incidència de DT1 en femelles (80%) és molt més elevada que en mascles (20%) (Solomon and Sarvetnick, 2004). En canvi, en humans no es manté aquesta tendència en la incidència de DT1 (Forga et al., 2018; Gale and Gillespie, 2001).

Una altra de les característiques del model NOD és l'agressivitat de l'atac autoimmune a l'illot. Les primeres cèl·lules infiltrant l'illot (periinsulitis) es poden trobar a partir de les 2 setmanes d'edat (Homo-Delarche, 2001; Jansen et al., 1994) i solen ser macròfags i cèl·lules dendrítiques. Seran aquestes cèl·lules les que més tard tindran una funció de CPA i presentaran els pèptids que hagin capturat a les cèl·lules B i T. S'ha observat que els macròfags residents en el pàncrees són de vital importància, ja que la seva eliminació redueix de forma important la incidència de DT1 en el model NOD (Carrero et al., 2017). De forma similar, els macròfags M2, que presenten un perfil de secreció de citocines antiinflamatori, també redueixen la incidència de DT1 en aquest model a la vegada que indueixen proliferació de la cèl·lula  $\beta$  pancreàtica (Parsa et al., 2012; Xiao et al., 2014). La fase de prediabetis en el model NOD dura al voltant de 8 setmanes (des de les 3-4 setmanes fins que trobem els primers casos de DT1 a partir de la setmana 12). Durant aquesta fase, les CPA capturaran autoantígens per a presentar-los a les cèl·lules T CD4 i CD8 i això farà que s'activin i que es dirigeixin al pàncrees per destruir la cèl·lula  $\beta$  mitjançant l'alliberació de citocines proinflamatòries com l'interferó  $\beta$  (IFN $\beta$ ) (Alba et al., 2004), IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  o la interleucina-17 (IL-17) en el cas dels limfòcits T CD4, mitjançant processos de citotoxicitat directa o per mitjà de Fas-Fas lligand en el cas dels limfòcits T CD8 (Jayasimhan et al., 2013). No solament els limfòcits T estan implicats en el progrés de la malaltia, altres tipus cel·lulars com els limfòcits  $\gamma\delta$  o les cèl·lules T assassines naturals invariants (iNKT) també produiran gran quantitat d'IL-17, sobretot en l'etapa de prediabetis que ajudarà al desenvolupament de la malaltia (Markle et al., 2013). Les iNKT, cèl·lules del sistema immune amb un TCR invariant amb la capacitat de reconèixer antígens lipídics, més abundants en el ratolí NOD és la productora d'IL-17 (Lee et al., 2015). Una població molt important són els limfòcits B. Tot i que la formació d'anticossos anti-insulina o anti-descarboxilasa de l'àcid glutàmic (GAD) no tenen una rellevància patogènica en la DT1 del model NOD (Hinman and Cambier, 2014), la depleció completa d'aquesta població redueix la incidència de DT1 en el NOD (Akashi et al., 1997). Per tant, aquestes cèl·lules estan implicades en la DT1. La seva funció és la de CPA mitjançant receptors de la cèl·lula B (BCR) antigen específics, que captaran de forma passiva els antígens alliberats per la cèl·lula  $\beta$ . S'ha demostrat que els limfòcits B tenen la capacitat d'estimular tant limfòcits T CD4 en el seu canvi cap a limfòcit T d'ajuda (Th) (Carrascal et al., 2016) com limfòcits T CD8 en la seva diferenciació cap a cèl·lula citotòxica (Brodie et al., 2008).

## 1.2 Factors prenatals i diabetis mellitus tipus 1.

En humans el sistema immunitari comença el seu desenvolupament a partir de la quarta setmana de l'embaràs, així que el fetus (fase de l'embaràs que durarà des de les 8 setmanes de gestació (SG) fins al part), a partir de les 23 SG presenta un sistema immunitari desenvolupat amb capacitat de respondre contra antígens abans del naixement (Adkins et al., 2004; Jones et al., 1996; van Well et al., 2017). No només això, sinó que la interacció del sistema immunitari de la mare amb el fetus també és de gran importància durant aquesta etapa. Com ja s'ha comentat, certs factors ambientals durant l'època prenatal poden influir en el sistema immunitari del nadó. Un primer punt clau per saber si un factor ambiental pot estar influint sobre el sistema immunitari és conèixer com es desenvolupa el sistema immunitari en el fetus.

### 1.2.1 Desenvolupament del sistema immunitari prenatal

#### 1.2.1.1 *Murí*

El rol del sistema immunitari en la DT1 és crucial com ja s'ha vist anteriorment. Canvis en el desenvolupament embrionari del sistema immunitari poden influenciar posteriorment l'aparició de la DT1 en els ratolins degut a l'alteració dels precursors hematopoètics. Els primers precursors de la hematopoesis es troben al sac vitel·li al dia 7.5 d'embriogènesis (E), on aquestes cèl·lules estan formant illes de sang. Aquestes illes són una barreja de precursors endotelials hematopoètics (Ueno and Weissman, 2006). Però, les cèl·lules mare hematopoètiques (CmH) que formaran el sistema immunitari són d'origen intra-embrioní i no del sac vitel·li (Golub and Cumano, 2013). Més tard, en l'adult trobem algun compartiment de macròfags, com la micròglia, que és originària del sac vitel·li (Ginhoux et al., 2010). Les primeres CmH intra-embrioniques són al fetge i melsa fetals a partir del dia E10. Aquestes CmH provenen del primordi que formarà l'aorta, les gònades i el mesonefre (AGM). Aquestes cèl·lules provenen del mesoderma i durant els dies E8.5 i E10 es produirà una única onada de diferenciació de cèl·lules del mesoderma cap a CmH (Godin et al., 2002). Les CmH del fetge acabaran migrant cap al moll d'os a partir del dia E17, gràcies al fet que ja tenim una xarxa de mesènquima suficientment desenvolupada per poder sostenir el creixement i diferenciació d'aquestes cèl·lules. A la melsa, l'hematopoesi comença una mica més tard. Tot i que a dia E10 ja podem trobar CmH, no és fins a dia E15 que comencen a expandir-se i diferenciar-se, arribant al pic d'expansió entre els dies E16.5 i E18.5 (Kiel et al., 2005). A diferència del fetge, la melsa no perd la seva capacitat hematopoètica durant tota la vida, tot i que la melsa adulta només produirà cèl·lules de la línia mieloide i eritròcits (Bertrand, 2006). D'altra banda, l'epiteli tímic rudimentari es forma al dia E9-10 i això permet que la primera colonització de limfòcits arribi a partir del dia E10-11. S'han descrit

dues arribades de precursors al timus, una primera durant el dia E13, que genera ràpidament la maduració de limfòcits T  $\alpha\beta$  i  $\gamma\delta$ , i una segona onada al dia E18, que tot i tenir una maduració més lenta, produirà molts més limfòcits que la primera tanda (Ramond et al., 2014). Això fa que aproximadament es trobaran els primers limfòcits que expressen el TCR  $\alpha\beta$  al dia E17. En canvi, la limfopoesi B comença a aparèixer al dia E12 al fetge, però no trobem els primers limfòcits B amb expressió d'immunoglobulina M (IgM) fins al dia E16 (Golub and Cumano, 2013). Al moll d'os es detecten precursors de cèl·lules B a partir del dia E19 i precursors de cèl·lules T a partir del naixement. El nombre de CmH al moll d'os va augmentant en els 4 mesos posteriors al naixement convertint-se en la zona primària d'hematopoesis del ratolí (Velardi and Cooper, 1984)

### 1.2.1.2 Humà

A diferència del ratolí, la majoria de cèl·lules del sistema immunitari ja es troben presents en el primer trimestre de l'embaràs. Per tant, en humans hi ha un desenvolupament del sistema immunitari més ràpid que en ratolí. L'exemple més clar és el moll d'os. En humans ja trobem CmH a les 11-12 (SG) (Migliaccio et al., 1986), mentre que en ratolí no trobem cèl·lules fins al final de la gestació, aproximadament cap al E17 (Holladay and Smialowicz, 2000), que equivaldria a 32 SG en humans.

Tot i aquesta clara diferència en els temps de generació de les diferents subpoblacions de cèl·lules del sistema immunitari, el desenvolupament segueix un patró molt similar. Com en el ratolí, els primers precursors hematopoètics els trobem al sac vitel·lí, entre les 3 i 4 SG. De forma similar al ratolí, en humans tenim una segona font de CmH que prové del mesoderma, igual que en el ratolí formarà el primordi de l'AGM. A partir de la cinquena SG les CmH migraran cap al fetge, que serà el principal lloc d'hematopoesi fins a les 22 SG. Arribat a aquest punt començarà a reduir la seva participació en aquest procés (van Well et al., 2017). Després del naixement, l'hematopoesi en el fetge finalitza. La melsa és desenvolupa a partir de la 8 SG, com altres òrgans secundaris del sistema immunitari (van Well et al., 2017). A la melsa trobem una hematopoesi activa a partir de les 12 SG (Sharma et al., 1997). A més, s'han observat CmH en les melses d'adults, conferint una capacitat hematopoètica continua a aquest òrgan (Dor et al., 2006). Això és gràcies al manteniment d'un estroma amb capacitat d'albergar aquestes CmH (Lim and O'Neill, 2019). L'organogènesi del timus va des de les 8 SG fins a les 20 SG. A les 8 SG apareixen les primeres CmH i progenitors de cèl·lules T que colonitzaran l'epiteli tímic. A les 15 SG els timòcits expressen un TCR complet, això permet que entre les 16 i les 20 SG es trobin limfòcits T a la sang del fetus (van Well et al., 2017; Ygberg and Nilsson, 2012). Seguint amb les similituds amb el ratolí, es detecten limfòcits B IgM positius en sang abans que limfòcits T, més concretament a partir de la 10 SG.

Els primers precursors dels limfòcits B es troben al fetge a partir de 7 SG. Tot i aquest començament tan ràpid, el nivell de cèl·lules plasmàtiques no augmenta fins a les 18 SG (Bofill et al., 1985). Les cèl·lules de la immunitat innata solen ser les primeres en aparèixer. Els macròfags apareixen a les 3-4 SG en el sac vitel·lí, tot i que no expressen el MHC classe II fins a les 7-8 SG (Janossy et al., 1986). Les cèl·lules NK apareixen a les 6 SG al fetge (Phillips, 1992) i els monòcits a les 8 SG al fetge (van Well et al., 2017). Exceptuant els neutròfils que no apareixen en un nombre significant fins després de les 31 SG (Davies et al., 1992). Totes aquestes cèl·lules tenen una resposta atenuada contra els antígens, de manera que s'evita l'inici de processos inflamatoris que podrien ser molt perjudicials per al fetus. A més, dèficits en l'adhesió i fagocitosis dels neutròfils i monòcits (Strunk et al., 2004) i una capacitat citolítica reduïda en les cèl·lules NK (Sato et al., 1999) estan àmpliament demostrades. Al mateix temps trobem que en el sistema immunitari adaptatiu hi ha una clara preferència per la resposta T d'ajuda 2 (Th2). A causa de citocines provinents de la placenta com la interleucina-10 (IL-10), la prostaglandina E2 i la progesterona, reduint encara més la possibilitat de processos inflamatoris aguts (Kollmann et al., 2009). Al moment del naixement el sistema immunitari encara és bastant immadur, però anirà guanyant funcionalitat durant el primer any de vida (Ygberg and Nilsson, 2012). Per aquest motiu l'aportació de cèl·lules immunitàries de la mare són importants per a la protecció del nadó en l'embaràs i la lactància. Durant l'etapa fetal s'han descrit limfòcits T reguladors (Treg) maternes que s'encarreguen d'evitar el rebuig del fetus i que la seva absència comporta un augment del risc d'avortament (Aluvihare et al., 2004). Però el sistema immunitari no està totalment inhibit, sinó que trobem un balanç estable entre cèl·lules Th1, Th2 i Th17 durant l'embaràs, amb presència de diverses citocines (Feyaerts et al., 2017; Ruocco et al., 2014). Això sí, l'augment de citocines, sobretot proinflamatories, com la IL-17 pot augmentar el risc de part prematur (Ito et al., 2010).

En resum, el sistema immunitari prenatal, és present durant el primer trimestre de la gestació, encara que no plenament funcional. Així, a partir de les 12 SG ja és possible influir i modificar el sistema immunitari del fetus a través de la mare amb la utilització de fàrmacs i altres molècules. El sistema immunitari del nadó no és completament funcional fins al naixement. Com ja hem mencionat anteriorment, s'han identificat factors ambientals durant la gestació que augmenten el risc de DT1. El fet que podrien estar afectant el sistema immunitari durant el seu desenvolupament podria explicar perquè aquests factors tenen capacitat de modificar la incidència de DT1.

Per tant, el desenvolupament del sistema immunitari del fetus, així com la interacció amb la mare són dos moments de gran importància, on qualsevol canvi pot comportar problemes en l'edat adulta.

## 1.2.2 Desenvolupament del pàncrees fetal

### 1.2.2.1 *Muri*

La diana de la DT1 son els illots pancreàtics, per tant el seu desenvolupament en l'etapa fetal pot ser clau en la malaltia, donat que canvis durant el desenvolupament fetal poden repercutir a l'edat adulta. Les primeres evidències de l'existència del pàncrees fetal són al dia E9.5, moment en què l'endoderma de l'intestí dorsal proximal s'espessirà i formarà una protuberància cap al mesènquima. A dia E10 apareixerà el pàncrees ventral primordial i el conducte biliar. Aquests 2 pàncrees primordials s'uniran a dia E12.5 rodejant el primordi duodenal, durant aquesta primera fase de 3 dies anomenada transició primària. Les primeres cèl·lules endocrines diferenciades seran cèl·lules  $\alpha$  productores de glucagó. En la segona transició hi haurà una proliferació molt més activa del pàncrees exocrí. L'epiteli es segregará entre el tronc i la cua, de manera que la majoria de precursors endocrins es trobaran a la zona del tronc. Aquestes cèl·lules seran les que al diferenciar-se i sortir de l'epiteli s'agregaran en illots. En la segona transició apareixen les primeres cèl·lules  $\beta$  i tota la resta de cèl·lules de l'illot pancreàtic. Tot aquest procés durarà des del dia E13 fins al dia E18 i aquest primers illots s'acumularan envoltant ductes i vasos sanguinis (illots emergents). Els progenitors endocrins es quedaran a l'epiteli per a posteriors rondes de proliferació endocrina que succeiran després del naixement. Aquests precursors són molt importants, ja que al naixement un 80% de les cèl·lules de l'illot provenen d'aquests precursors (Bouwens and Rooman, 2005). Per finalitzar, a partir del dia E16.5 les cèl·lules exocrines provocaran una forta expansió de l'epiteli pancreàtic per acabar de definir la forma final del pàncrees (Pan and Wright, 2011).

### 1.2.2.2 *Humà*

El desenvolupament fetal de l'òrgan diana de la DT1 en humans és molt similar al descrit en ratolí. El pàncrees comença el seu desenvolupament a finals del primer mes, quan l'endoderma es plega per formar l'intestí proximal adjacent al notocordi (Pan and Wright, 2011). El notocordi influencia els patrons de l'intestí proximal perquè deixin d'expressar la proteïna sonic hedgehog (SHH) i permetin l'expressió de PDX1, fet que provoca el desenvolupament del brot pancreàtic dorsal i ventral. A diferència del ratolí, no hi ha una expansió primària de progenitors de cèl·lules endocrines (Jennings et al., 2013; Villasenor et al., 2008), sinó que s'observa una proliferació continua dels progenitors cel·lulars fins a la unió dels pàncrees dorsals i ventrals. A les 7 SG es diferencien les cèl·lules que formen el tronc (cèl·lules endocrines) de les cèl·lules que formen la cua (cèl·lules exocrines) per l'expressió de factors de transcripció específics de cada llinatge. Bàsicament les cèl·lules del tronc expressen menor quantitat de GATA4 que les cèl·lules de la cua (Jennings et al., 2015). Aquest pàncrees primordial serà pluripotent fins a aproximadament a les 8



SG (Castaing et al., 2001, 2005), però les cèl·lules  $\beta$  diferenciades veuran fortament reduïda la seva capacitat de proliferació. Aproximadament a les 10 SG els illots ja presenten una bona vascularització i entre les 12-13 SG ja presentaran tots els tipus cel·lulars (Jennings et al., 2013; Piper et al., 2004). En definitiva en humans els illots pancreàtics estan perfectament formats entre les 28 SG i 35 SG (McGrath et al., 2015), i per tant la massa de cèl·lula  $\beta$  al naixement dependrà més de la capacitat de proliferació i de l'apoptosi d'aquestes cèl·lules que de processos de diferenciació. Cal destacar que tot i tenir cèl·lules  $\beta$  funcionals, el fetus dependrà de la mare per a regular els nivells de glucosa (Otonkoski et al., 1988).

En conclusió, el desenvolupament del pàncrees s'allarga durant quasi tota l'etapa embriogènica i fetal, de manera paral·lela al sistema immunitari, l'altre gran implicat en el desenvolupament de la DT1. Això comporta que un únic estímul pugui afectar a moments crítics del desenvolupament d'aquests dos sistemes.

### 1.2.3 Durada de la gestació com a factor de risc

Com ja s'ha mencionat, el desenvolupament del pàncrees i del sistema immune s'allarga durant tota l'etapa fetal. En ratolí, la gestació dura 21 dies i la majoria d'òrgans comencen el seu desenvolupament a partir del dia 7, fet que ens deixa uns 14 dies on els diferents canvis en l'ambient i en la mare poden arribar a afectar el fetus. Rarament s'observen gestacions de menys de 20 dies en el model NOD. S'ha demostrat que nivells excessius d'estrès poden modificar la incidència de DT1 en el model de ratolí NOD. També s'ha vist que canvis en les condicions d'establució modifiquen la incidència. En humans la gestació durà aproximadament 40 setmanes, amb un estadi embrionari que dura fins a les 8 SG. Un cop entrem en l'estadi fetal, com ja hem vist anteriorment, s'inicia el desenvolupament dels diferents òrgans. A diferència del ratolí es tindrà una finestra molt més gran (fins a 32 setmanes) on canvis en l'ambient podrien afectar el fetus, així com també trobarem més probabilitats de què la mare pateixi algun tipus de malaltia durant l'embaràs. A més, a diferència del ratolí, en humans es descriuen 4 tipus de naixements depenent de les SG del nadó. El primer tipus són els nadons preterme, infants que neixen entre les 24 i les 36 SG. Evidentment com menys SG tingui el nadó al naixement menys probabilitats de sobreviure. Aquests nadons presenten una sèrie de complicacions durant tota l'etapa neonatal principalment relacionades amb el desenvolupament i la conducta (Petrou, 2019). Un dels problemes principals al naixement dels nadons prematurs, és la síndrome de dificultat respiratòria aguda, ja que almenys un 20% dels nadons preterme presenten algun problema relacionat amb el sistema respiratori (Hibbard et al., 2010). Una de les principals causes de mortalitat dels nadons prematurs és aquesta síndrome de dificultat respiratòria aguda (Crowther et al., 2011; Yan et al., 2018) i la síndrome de mort sobtada (King et al., 2014). S'ha demostrat que les dones amb DT1 tenen un risc augmentat de

patir un part prematur espontani a causa dels elevats nivells de glucosa en sang (Köck et al., 2010; Ludvigsson et al., 2019). En canvi, trobem més controvèrsia en quant la relació entre la prematuritat i el desenvolupament de DT1 al llarg de la vida, tot i que sembla que augmenta el risc de la DT1 a causa del naixement abans de les 37 SG (Li et al., 2014). Aquests estudis remarquen la importància de les SG en la salut del nadó. Entre les 37 SG i abans les 38 SG els naixements s'anomenen "a terme primerenc". La gran diferència d'aquests nadons amb els nadons preterme és la maduració dels òrgans. Tot i això, presenten més complicacions en l'etapa neonatal, sobretot presenten un major nombre d'hospitalitzacions i de problemes de desenvolupament que no pas els nadons nascuts a terme (Petrou, 2019). També la seva taxa de mortalitat és més elevada que la dels nadons nascuts a terme, però menor que la dels nadons prematurs (King et al., 2014). Els nadons nascuts a terme es troben entre les 38 i les 42 SG. Aquí es troben la majoria de naixements i per tant el que és més fisiològic en l'espècie humana i aquest part equivaldria als 21 dies de gestació del ratolí. Passades les 42 setmanes es troben els nadons post-terme. En aquest cas perilla la vida de la mare i del nadó per igual però no per una falta de desenvolupament de la criatura.

### *1.2.3.1 Influència prenatal de fàrmacs i drogues*

Un factor ambiental i prenatal clau en el desenvolupament del sistema immunitari i de la DT1 és la utilització de fàrmacs i drogues durant l'embaràs. Les agències de medicaments recomanen reduir al màxim el nombre de fàrmacs utilitzats durant la gestació. En casos de malalties de la mare que requereixen d'un tractament perllongat, es recomana utilitzar fàrmacs que siguin el menys agressius possible amb el fetus. Existeix una escala de risc que valora la perillositat dels fàrmacs contra el fetus (Andrade et al., 2004; Sachdeva et al., 2009). Tot i que no es coneix el possible efecte prenatal de la gran majoria de fàrmacs a causa de la falta d'estudis que avaluïn els riscos al fetus, cal preveure que molts dels fàrmacs induiran problemes en el desenvolupament del fetus o augmentaran el risc d'un part prematur (Sachdeva et al., 2009). No només els fàrmacs poden afectar el fetus, sinó que la ingesta de suplementes, com el ferro durant l'etapa prenatal és un factor de susceptibilitat de la DT1 en els nens (Størdal et al., 2018), així com la ingesta de grans quantitats de nitrats i derivats, que també estaria afectant l'augment de DT1 (Dahlquist et al., 1990; Samuelsson et al., 2011).

Respecte a les drogues, els efectes que indueixen sobre el fetus són més perillosos. Especialment durant les primeres 8 SG tenen capacitats teratogèniques, fet que incrementarà el risc del nadó a patir malformacions (Bhenke and Smith, 2013). A partir de les 8 SG els efectes seran més subtils, però igualment perillosos. Els principals efectes durant l'embaràs estan relacionats amb el desenvolupament del cervell, alteracions en els neurotransmissors del fetus, retard en el creixement per

una menor síntesis de proteïnes, menor arribada de nutrients per part materna i hipòxia a causa de la reducció del torrent sanguini del cordó umbilical. Fins i tot, al naixement, alguns nadons tenen episodis de síndrome d'abstinència per l'exposició prenatal a certes drogues com l'alcohol (Oei, 2018). A més, s'ha observat efectes postnatsals com problemes d'aprenentatge, comportament i creixement (Bhenke and Smith, 2013).

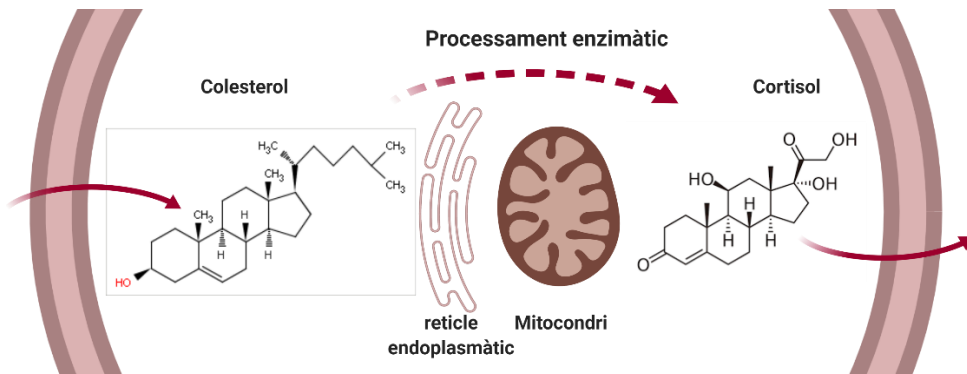
En resum, l'època prenatal és altament delicada ja que els estímuls externs poden fàcilment alterar el correcte desenvolupament del fetus i aquests canvis podran influir durant tota la vida.

### 1.3 Glucocorticoides

Els glucocorticoides són una família de molècules de baix pes molecular de la família de les hormones esteroides. Aquestes hormones són produïdes per a la zona fasciculada del còrtex adrenal i la seva secreció està controlada per l'eix hipotalàmic-pituïtari-adrenal (HPA) sota un cicle circadià o per l'efecte de l'estrès (Nicolaidis et al., 2017). Presents de forma endògena en la majoria d'organismes, la seva funció principal és el manteniment de la homeòstasi entre estrès i repòs. A escala cel·lular controla la proliferació, diferenciació i l'apoptosi, així com pot induir canvis en la metilació i en les illes de seqüències riques en citocines i guanines (illes CpG) alterant l'epigenètica de les cèl·lules afectades (Nicolaidis et al., 2017; Zannas and Chrousos, 2017). En medicina, s'han utilitzat molt els glucocorticoides sintètics pel seu efecte immunosupressor i antiinflamatori, i per al tractament de diverses malalties de caràcter immunològic.

#### 1.3.1 Glucocorticoides sintètics

Els glucocorticoides sintètics són derivats dels glucocorticoides endògens. Aquests glucocorticoides tenen dues formes: la forma activa són el cortisol (humà) i la corticosterona (ratolí) i la forma inactiva són la cortisona (humà) i la 11-dehidrocorticosterona (ratolí). L'equilibri entre les dues formes és controlat per un isoenzim anomenat 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. La isoforma 1 (11 $\beta$ -HSD1) s'encarrega de passar de la forma inactiva a la forma activa, mentre que la isoforma 2 (11 $\beta$ -HSD2) farà el procés contrari (Draper and Stewart, 2005). Els glucocorticoides són molècules lipòfiles, per tant, per facilitar l'administració es formulen com a èsters amb grups fosfats, succinats o propionats, per augmentar la seva hidrofília. També es poden administrar directament petites dosis amb una dissolució alcohòlica (Czock et al., 2005).



**Figura 2. Síntesis endògena de cortisol:** Les cèl·lules de les glàndules adrenals utilitzen el colesterol per a la síntesis enzimàtica del cortisol. Aquest procés està controlat per l'eix HPA. Figura creada amb **Biorender.com**

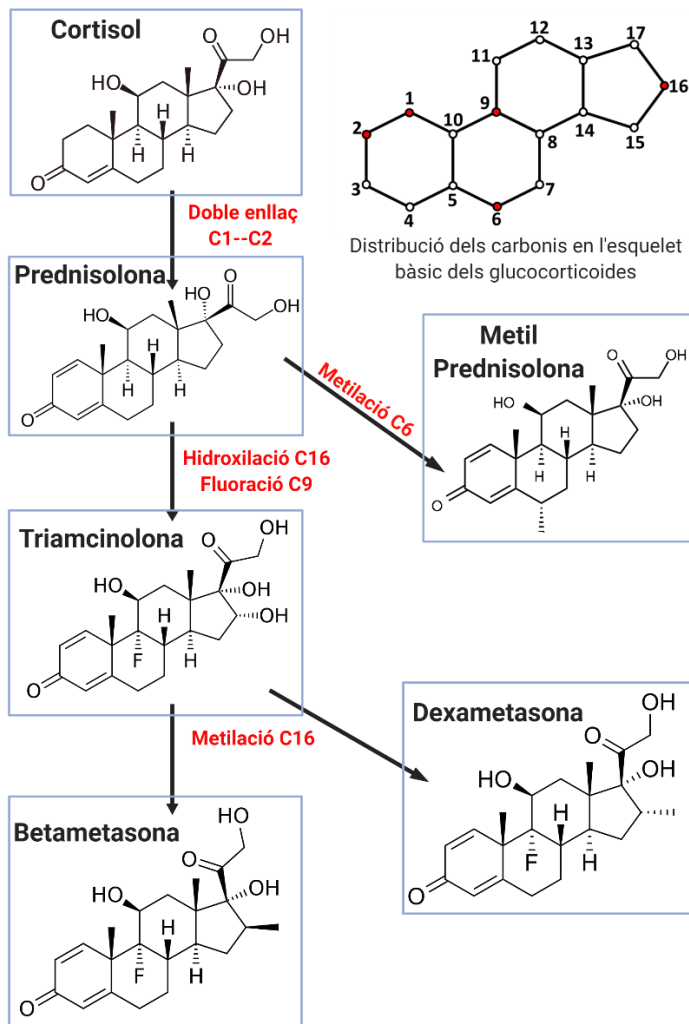
El primer tractament amb un glucocorticoide, més concretament amb cortisol, va ser per a l'artritis reumatoide l'any 1949 (Hench and Kendall, 1949). Des d'aquest moment s'han intentat desenvolupar diferents molècules sintètiques a partir de l'esquelet químic dels esteroides. Aquestes molècules, que provenen del colesterol, seran processades enzimàticament en les cèl·lules de la glàndula adrenal (Miller, 2008), primer pel reticle endoplasmàtic i després per la mitocondria, on s'acabarà sintetitzant el cortisol (Figura 2). En l'elaboració sintètica de glucocorticoides s'utilitza el cortisol com a base i es perfecciona l'eficàcia, la biodisponibilitat, reduir la interacció amb el receptor dels mineralocorticoides i augmentar l'efecte immunosupressor.

Simplement afegint un enllaç doble entre els carbonis 1 $\alpha$  i 2 $\alpha$  es transformarà el cortisol en prednisolona, millorant 4 vegades l'eficàcia d'aquesta molècula. Altres modificacions notables dels esteroides són la hidroxilació o metilació del carboni 16 $\alpha$ , així com la fluoració del carboni 9 $\alpha$  per tal d'augmentar l'efecte antiinflamatori dels esteroides (Figura 3). La betametasona i la dexametasona combinen totes aquestes modificacions, i a més són considerades epímers perquè només canvien l'orientació d'un dels radicals de la molècula, més concretament la del grup metil unit al carboni 16 $\alpha$  (Chang, 2014). Els glucocorticoides més potents són els inhalats i tenen una gran capacitat d'unir-se al receptor de glucocorticoides, cosa que indueix un fort efecte local però amb un efecte sistèmic molt reduït degut a la curta durada del seu efecte i la facilitat de ser eliminats metabòlicament (Daley-Yates, 2015).

Gràcies als seus efectes immunosupressors s'han utilitzat en la pràctica clínica diferents glucocorticoides resumits en la Taula 1. Cal tenir en compte que la potència del glucocorticoide es determina per la seva capacitat de supressió de l'activitat dels eosinòfils i d'aturar la inflamació. Així com també s'avalua la capacitat d'estimular els dipòsits de glicogen en cèl·lules hepàtiques. Un dels avantatges

d'utilitzar glucocorticoides sintètics és que tenen una baixa afinitat per la 11 $\beta$ -HSD2 i això fa que augmenti la vida mitjana de les molècules dins les cèl·lules.

El glucocorticoide en el que es centra aquest treball és la betametasona. Aquesta forma modificada del cortisol té un pes molecular de 392,46g/mol i presenta la mateixa fórmula química que la dexametasona (C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>FO<sub>5</sub>) però amb una conformació espacial diferent. L'aspecte és de pols blanca, té un punt de fusió de 232°C i és poc soluble en aigua però es dissol fàcilment en compostos alcohòlics (LogP = 1.8). De forma similar als glucocorticoides endògens, aquestes molècules s'uniran al receptor de glucocorticoides (RG) com a agonistes, provocant l'activació d'aquest receptor.



**Figura 3. Elaboració sintètica de la betametasona:** Canvis des del cortisol fins a la betametasona i dexametasona. A dalt a la dreta esquema de la distribució dels carbonis de l'esquelet dels esteroides. Figura creada amb **Biorender.com**

**Taula 1. Principals glucocorticoides utilitzats en la practica clínica.** Molècules base, sense grups químics afegits.

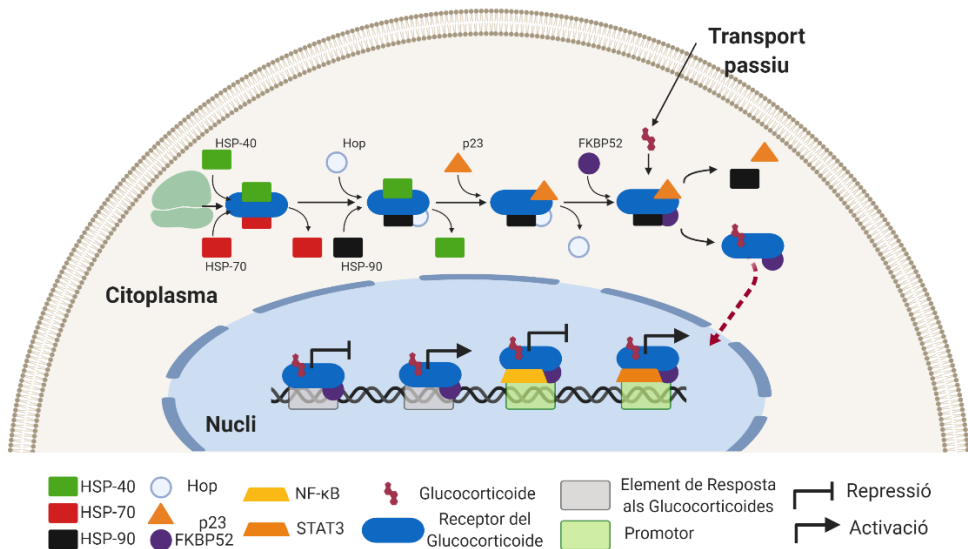
Glucocorticoide	Potencia relativa (Hidrocortisona)	Duració efecte cel·lular (hores)	Tipus d'administració
Hidrocortisona/ Cortisol	1	8-12	Sistèmic/oral
Cortisona	0,8	8-12	Sistèmic/oral
Prednisona	4	18-36	Sistèmic/oral
Prednisolona	4	12-36	Sistèmic/oral
Metilprednisolona	5	18-36	Sistèmic/oral
Triamcinolona	5	12-36	Sistèmic/oral
Dexametasona	25-30	36-72	Sistèmic/oral
Betametasona	<b>25-40</b>	<b>36-54</b>	<b>Sistèmic/oral</b>
Fludrocortisona	10	18-36	Sistèmic/oral
Budesonida	3750	1,5-2,8	Inhalat
Fluticasona	7200	3,1-14	Inhalat
Mometasona	8800	4,5	Inhalat
Beclometasona	2100-5400	0,5-2,7	Inhalat
Ciclesonida	4800	0,7-7	Inhalat

### 1.3.2 Mecanisme d'acció

Com s'ha mencionat en l'apartat anterior, els glucocorticoides s'uneixen amb gran afinitat al RG. Aquest receptor s'expressa de forma constitutiva en totes les cèl·lules i a més els glucocorticoides endògens també tenen certa afinitat pel receptor dels mineralocorticoides. El RG està codificat pel gen NR3C1 i consta de 2 regions importants. A la zona N terminal trobem el domini de transactivació i el domini d'unió a l'àcid desoxiribonucleic (DNA), i a la zona C terminal trobem el domini d'unió a lligands (en aquest cas els glucocorticoides). Separant la regió N terminal i C terminal trobem un espaiador.

Aquest receptor té dues isoformes principals, el RG- $\alpha$  i el RG- $\beta$ . A més, depenent del processament de l'àcid ribonucleic (RNA) missatger (mRNA), tindrem diferents variants tant del RG- $\alpha$  com del RG- $\beta$ . La principal diferència entre els receptors  $\alpha$  i  $\beta$  és l'absència de 50 aminoàcids en la zona C terminal del receptor  $\beta$ . El RG- $\beta$  s'expressa en menor quantitat en comparació amb el RG- $\alpha$  (Oakley and Cidlowski, 2011a). El RG necessita diverses proteïnes per tal d'adquirir la conformació adequada per a poder unir-se a les molècules de glucocorticoides. Al citoplasma trobarem el receptor formant un complex multi proteic necessari per a poder

reconèixer amb gran afinitat el seu lligand. Per tal que el plegament del RG sigui correcte, necessitarem dues proteïnes, la proteïna de xoc tèrmic (Hsp) 40 i la Hsp-70 (Russell et al., 1999). Un cop tenim el RG plegat, s'unirà a la Hsp-70, la coxaperona Hop, proteïna que s'encarregarà de substituir la Hsp-70 per una Hsp-90. Per tal d'estabilitzar la unió entre el RG i la Hsp-90, s'unirà al complex la proteïna p23 i finalment la coxaperona Hop serà desplaçada per les immunofilines FKBP52, FKBP51 i ciclofilines o la proteïna fosfatasa 5. Aquest últim canvi acabarà d'estabilitzar el complex RG-Hsp-90, caracteritzat per tenir una afinitat pels glucocorticoides 100 vegades major que el RG sense el complex proteic (Nemoto et al., 1990) gràcies al fet que les proteïnes ajuden a establir el lloc d'unió del RG amb el seu lligand. Un cop s'ha unit el lligand, el RG alliberarà totes les proteïnes que tenia unides i es traslladarà fins al nucli amb l'ajuda de la proteïna FKBP52 o utilitzant una importina. En alguns casos tot el complex RG-Hsp-90 acabarà dins el nucli (Grad and Picard, 2007). Un cop dins el nucli el RG podrà fer la seva funció com a factor de transcripció (FT) mitjançant els elements de resposta als glucocorticoides (ERG), activant o inhibint gens o unint-se a altres FT per tal d'inhibir o incrementar la seva funció (Oakley and Cidlowski, 2011a).



**Figura 4. Mecanisme d'acció dels glucocorticoides:** esquema de la ruta clàssica i dels possibles efectes en l'expressió gènica. Figura creada amb **Biorender.com**

En diferents estudis s'ha vist com els glucocorticoides modifiquen l'expressió d'una gran quantitat de gens. Aquest efecte és gràcies a la interacció directa o indirecta del RG contra diferents FT (Figura 4). Entre els FT inhibits a causa del RG trobem el NF-κB (Ray and Prefontaine, 1994), el AP-1 (Jonat et al., 1990), el STAT6 (Biola et al., 2000), el GATA1 (Chang et al., 1993) i el T-bet (Lieberman et al., 2007), entre altres (Cain and Cidlowski, 2017). D'altra banda, els FT STAT3 i 5 s'han trobat amb activitat

augmentada a causa del RG (Stocklin et al., 1996; Zhang et al., 1997). Alguns d'aquests factors són realment importants per al sistema immunitari. Així per exemple, tant NF- $\kappa$ b com AP-1 són essencials per a la transducció de la senyal provinent del TCR o del BCR i per tant primordials per a la selecció d'aquestes cèl·lules i per l'activació de la immunitat adaptativa (Cain and Cidowski, 2017).

Un efecte cel·lular dels glucocorticoides àmpliament demostrat és la generació de DCs tolerogèniques. Per assolir aquest efecte s'utilitzen dexametasona o prednisolona, ja que aquests dos glucocorticoides inhibiran l'expressió de molècules clau en l'estimulació de la resposta immunitària evitant l'activació dels limfòcits (Luther et al., 2009; Naranjo-Gómez et al., 2011; Zhao et al., 2018), probablement degut a la repressió dels FT NF- $\kappa$ b i AP-1 per part del RG. Altrament, en neutròfils també provoquen un clar efecte, reduint l'expressió de molècules d'adhesió en la membrana, com ara CD62L, i al mateix temps indueixen canvis en la matriu d'actina, provocant que no es puguin adherir correctament a les parets dels vasos sanguinis i augmentant dràsticament el nombre de neutròfils en el torrent sanguini, evitant l'extravasació d'aquestes cèl·lules cap als teixits (Barak et al., 1992; Fay et al., 2016; Weber, 2003).

### 1.3.3 Ús mèdic de la betametasona

La betametasona es pot trobar en diferents formes farmacèutiques, formulada com a líquid, crema o aerosol. La betametasona en crema, gel o loció s'utilitza generalment de forma tòpica per al tractament de malalties cutànies, com la dermatitis o la pell atòpica, així com també s'utilitza per al tractament de les plaques psoriàsiques. En aerosol s'utilitza per al tractament de l'asma i de l'al·lèrgia per vies respiratòries. La formulació injectable té un ús més sistèmic, generalment com a immunosupressor o antiinflamatori, tot i que la betametasona no és la molècula amb l'efecte immunosupressor més potent. Sinó que, l'agent actiu més utilitzat com a immunosupressor és la dexametasona.

Un altre ús dels glucocorticoides, no relacionat amb malalties immuno-mediades, és el tractament del fetus per induir la maduració dels pulmons. La betametasona ha demostrat ser l'agent actiu més efectiu per induir aquest efecte (Liggins and Howie, 1972) en casos d'embarassos amb risc de part prematur.

#### 1.3.3.1 *Betametasona i maduració pulmonar fetal*

L'any 1972 es va descobrir que els glucocorticoides administrats a la mare eren capaços de millorar la supervivència dels nadons que neixen abans de les 37 SG, ja que aquest fàrmac induïa una ràpida maduració dels pulmons fetals reduint la incidència de col·lapses pulmonars i altres problemes respiratoris després del naixement (Liggins and Howie, 1972). Els glucocorticoides tenen un efecte directe



sobre els alvèols pulmonars, incrementant la producció de surfactant pulmonar i evitant així que els alvèols perdin la seva estructura en perdre el suport del líquid amniòtic després del naixement. En aquest mateix estudi es van provar diferents agents actius corresponents a la família dels glucocorticoides sintètics, i, d'entre aquests, el que va obtenir millors resultats amb menors complicacions secundàries va ser la betametasona. Avui en dia, la betametasona és l'agent actiu més utilitzat per a realitzar aquesta intervenció mèdica, tot i que també es pot utilitzar la dexametasona de forma similar. Un cop detectat un embaràs amb risc de prematuritat, generalment es procedeix a fer un tractament amb glucocorticoides. La ruta d'administració de la betametasona quan s'utilitza per madurar els pulmons fetals és intramuscular. El tractament consta generalment de 2 dosis administrades a la mare, de 12mg cadascuna amb 24 hores de diferència entre dosis (Miracle et al., 2008). En casos on la possibilitat de part és imminent es poden donar les 2 dosis separades només per 12 hores entre elles, produint un efecte sobre els pulmons del fetus similar a les 24 hores, però augmentant lleugerament els efectes secundaris del tractament (Khandelwal et al., 2012). Així, s'administra a dones amb risc de tenir un part prematur, entre les 24 i 34 setmanes d'embaràs, i a dones en les quals el fetus presenti evidència d'immaduresa pulmonar o hagin patit ruptura de les membranes de forma prematura entre les 24 setmanes i les 32 setmanes. En canvi, el seu ús no està recomanat per a aquelles mares que sofreixin una infecció sistèmica. És un medicament de ràpid efecte i en 24 hores ja s'aprecien millores en la supervivència dels infants prematurs (Miracle et al., 2008). Passats 7 dies l'eficàcia del tractament disminueix de forma considerable i per tant s'hauria de tornar a tractar la mare amb 2 dosis més de betametasona. Per això, és molt importat administrar el fàrmac en el moment correcte per evitar aquest possible problema (Crowther et al., 2011).

L'ús de la betametasona prenatal està augmentant en els darrers anys. Això es degut a que aquest fàrmac està directament lligat al número de possibles parts prematurs que hi hagi. El risc de part prematur depèn entre altres factors de l'edat materna, sent molt elevat als extrems d'edat, es a dir en noies menors de 15 anys i majors de 35 any (Baroutis et al., 2013). Al mateix temps, l'edat de les mares cada cop és major, augmentant el nombre de naixements de mares amb més de 35 anys (Laopaiboon et al., 2014). A part de l'edat de la mare, els tractaments de reproducció assistida i l'augment de embarassos múltiples per aquesta causa, també tenen un risc augmentat de patir un part prematur respecte als embarassos d'un sol fetus (Merritt et al., 2014). Aquest procediments de reproducció assistida són cada cop més utilitzats (Kupka et al., 2016) sobretot a Europa i Estats Units d'Amèrica. Aquests dos fets contribueixen a l'augment global de parts prematurs (Blencowe et al., 2012; Xu et al., 2015), correlacionant per tant amb un augment en l'ús de la betametasona prenatal.

### 1.3.4 Efectes prenatals dels glucocorticoides

El tractament amb glucocorticoides pot fer-se des de les 24 SG i fins a les 34 SG en alguns casos. Si recordem el que s'ha mencionat sobre el desenvolupament del pàncrees i el sistema immunitari en humans, fins a les 28-35 SG no es troben illots totalment madurs en el pàncrees i fins al naixement no s'observa un sistema immunitari totalment activat i funcional en el nadó. Per tant seria lògic pensar que aquest tractament pot afectar precursors o cèl·lules del nadó a part dels pulmons.

És evident que els glucocorticoides poden travessar la barrera materno-fetal, tal com es demostra visiblement amb la maduració dels pulmons (Liggins and Howie, 1972). La presència de glucocorticoides de la mare al nadó és normal durant l'embaràs, tot i que generalment els nivells són entre 5 i 10 vegades més baixos en el fetus que en la mare, exceptuant les setmanes anteriors al part (Fowden and Forhead, 2015), ja que els glucocorticoides són vitals per a la correcta maduració dels òrgans (Nyirenda and Seckl, 1998; Solano et al., 2016). El control del nivell de glucocorticoides en el fetus l'efectua l'enzim  $11\beta$ -HSD2, que trobem en gran quantitat a la placenta inhibint la gran majoria del cortisol produït per la mare. Però en certes ocasions aquesta barrera enzimàtica no pot evitar l'entrada massiva de glucocorticoides. En el cas del cortisol, produccions excessives d'aquesta molècula a causa d'episodis d'estrès poden arribar a saturar la  $11\beta$ -HSD2 arribant una quantitat major de la necessària al fetus. En el cas dels glucocorticoides sintètics com la betametasona, la baixa afinitat de l'enzim contra aquestes molècules permet el seu pas per la placenta sense cap obstacle (Solano et al., 2016).

Els efectes de la sobreexposició de glucocorticoides en el fetus seran altament dependents de l'estadi de desenvolupament de l'òrgan afectat. Per tant l'ús de glucocorticoides durant les 24 a 34 SG pot afectar la maduració final tant del pàncrees com del sistema immunitari. En humans s'ha observat que la utilització de glucocorticoides sistèmics augmenta lleugerament (ratio de perill, HR=1.2) la possibilitat de desenvolupar DT1 en la descendència (Greene et al., 2013). Aquest interessant i únic estudi remarca la possibilitat dels glucocorticoides com agents inductors de la DT1, però a l'englobar tots els glucocorticoides en l'estudi no podem determinar els efectes concrets de cada molècula. En altres malalties immuno-mediades sí que s'observa un increment del risc després del tractament amb glucocorticoide. En animals, l'efecte més observat és la resistència a la insulina en les cries tractades amb glucocorticoides prenatals (Sheen et al., 2016). A més, problemes neurològics, de creixement i de comportament estan associats amb el tractament prenatal amb glucocorticoides. D'altra banda, aquests problemes son els mateixos que s'observen a causa d'un excés de glucocorticoides endògens, com el cortisol, després d'episodis d'estrès elevat (Solano et al., 2016; Tomaszewska and Dobrowolski, 2011). Queda clar que un excés no fisiològic i prolongat de

glucocorticoides durant l'etapa prenatal pot ser perjudicial per al fetus i pot comportar problemes en l'edat adulta.

### 1.3.5 Efectes dels glucocorticoides en altres malalties immuno-mediades.

Com s'ha mencionat anteriorment la betametasona, com la majoria de glucocorticoides, es caracteritza per les seves propietats antiinflamatòries i immunosupressores i s'ha utilitzat per al tractament de diferents malalties immuno-mediades. A continuació, s'exposa un resum dels efectes i avantatges dels glucocorticoides en el tractament de diferents malalties immuno-mediades.

#### 1.3.5.1 Asma

L'asma és un desordre respiratori amb un fort component al·lèrgic. Es caracteritza per una obstrucció de les vies respiratòries a causa d'una inflamació i rigidesa dels bronquis (Fireman, 2003). Encara que l'asma és reversible, la contínua inflamació de les vies respiratòries provocarà canvis estructurals permanents que redueixen la capacitat pulmonar (Holgate and Polosa, 2006). Un dels possibles tractaments per l'asma és la utilització de glucocorticoides inhalats (Yawn, 2008), de forma continuada per tal de controlar la malaltia, juntament amb glucocorticoides orals i intramusculars que també ajuden a evitar possibles recaigudes després d'un episodi asmàtic greu (Chan et al., 2001). Part de la seva funció es basa en mantenir la integritat i funcionalitat de la barrera epitelial respiratòria contra possibles al·lèrgens com el rinovirus humà o tòxics pulmonars com el tabac (Waltl et al., 2018). Aquesta barrera és de vital importància per la regulació de la resposta immunitària en les vies respiratòries (Xiao et al., 2011).

#### 1.3.5.2 Esclerosi múltiple

Els glucocorticoides s'utilitzen en aquesta malaltia per tal d'aturar els episodis d'exacerbació aguda durant l'atac al sistema nerviós central causat per la malaltia (Berkovich, 2016; Frohman et al., 2007; Smets et al., 2017). Per al tractament s'utilitza una dosi intravenosa elevada en un període curt de temps. L'efecte principal que provoca el tractament és l'apoptosi dels limfòcits T (McCombe et al., 1996), la reducció de migració d'aquestes cèl·lules cap al sistema nerviós central (Elovaara et al., 1998) i la reducció de l'obertura de la barrera hemato-encefàlica produïda per les metal·loproteases (Rosenberg et al., 1996), reduint la inflamació de forma molt efectiva. Generalment el glucocorticoide més utilitzat per aquesta malaltia és la metilprednisolona (Frohman et al., 2007), però és possible utilitzar també dexametasona o betametasona, ja que indueixen resultats similars o són més aconsellables en certs moments depenent de l'estat fisiològic de la persona, com per exemple durant l'embaràs (Stuart and Bergstrom, 2011).

### 1.3.5.3 *Psoriasis*

En aquest cas, derivats de la betametasona s'apliquen directament a la pell afectada per plaques psoriàsiques en forma de gel, crema, loció o oli corporal. S'utilitza a causa dels seus efectes antiinflamatoris, immunosupressors i la seva capacitat d'inhibir la proliferació cel·lular en la seva zona d'acció. Depenent de la conjugació del glucocorticoide, s'utilitza per diferents zones del cos. Per exemple, la betametasona dipropionat en format de loció es considera molt potent i s'aplica principalment en mans i peus. Per a les lesions al tronc i cames s'utilitzen un ampli espectre de glucocorticoides, des de la betametasona valerat fins a mometasona o hidrocortisona. Altres molècules de la família com la dexametasona o la metilprednisolona tenen un efecte molt menys potent en les plaques psoriàsiques i s'utilitzen per a zones delicades com la cara, els genitals o els plegaments (Federman et al., 1999). A més de reduir la inflamació s'ha demostrat que la betametasona pot induir DCs tolerogèniques a la pell (cèl·lules de Langerhans), reduint encara més l'autoimmunitat contra els queratinòcits i la possibilitat d'aparició de dermatitis atòpica (Alhadj Ali et al., 2015).

### 1.3.5.4 *Artritis reumatoide*

Com ja s'ha mencionat anteriorment l'artritis reumatoide va ser la primera malaltia autoimmune tractada amb glucocorticoides l'any 1949 (Hench and Kendall, 1949). Els glucocorticoides s'utilitzen per a reduir la inflamació que es produeix en les articulacions i en el líquid sinovial, reduint sobretot la concentració d'IL-1 $\beta$ , d'interleucina-6 (IL-6) i TNF $\alpha$  (Kirwan and Power, 2007), principals causants de la inflamació en aquesta malaltia. A més, també es produeix una repressió del FT NF- $\kappa$ B a causa dels glucocorticoides reduint la producció de citocines proinflamatòries. En aquest cas, el glucocorticoide d'elecció s'injecta directament a l'articulació afectada per tal de produir un ràpid alleujament dels símptomes (Hetland et al., 2012). També hi han formulacions orals per tal de produir un efecte més llarg en el temps i així reduir la rigidesa matinal que es produeix degut a l'increment de citocines proinflamatòries que es produeixen per la nit, moment en el que el cortisol està més baix per el cicle circadià (Buttgereit et al., 2010). Una altra ruta d'administració és utilitzant liposomes per encapsular el glucocorticoide corresponent, ja que aquests liposomes s'acumulen de forma passiva al teixit diana millorant la concentració local i produint una major durada de l'efecte (Ozbakir et al., 2014; Ulmansky et al., 2012). Tot i això, el tractament durant llargs períodes de temps amb glucocorticoides segueix tenint una sèrie d'efectes sistèmics perjudicials a l'eix HPA, als osteoclastos o en la pressió sanguínia (Habib, 2009).

En resum, els glucocorticoides tenen un ampli espectre d'acció en diferents malalties immuno-mediades, especialment pels seus efectes immunosupressors i la seva capacitat de controlar els processos inflamatoris provocats pel propi sistema

immunitari. Tot i això, els problemes secundaris induïts pel tractament amb glucocorticoides segueixen sent elevats i poden provocar efectes desconegut i no desitjats.

---

---

*Hipòtesi i*  
*Objectius*

---

---



## 2. Hipòtesi

La DT1 és una malaltia autoimmune sense una etiologia clara. Apart dels factors genètic, diversos factors ambientals contribueixen a inclinar la balança cap a la malaltia. En aquest sentit, els factors prenatals estan adquirint cada dia més importància en l'àmbit de la DT1.

La betametasona és un glucocorticoide molt utilitzat en mares gestants per augmentar la supervivència del nadó en cas de risc de part prematur. L'ús de la betametasona per a la maduració pulmonar dels nadons està augmentant, ja que creix la incidència de parts prematurs. No hi ha dades de l'efecte prenatal de la betametasona sobre el desenvolupament de la DT1. La betametasona no només farà la seva funció de madurar els pulmons fetals, sinó que podria estar afectant altres cèl·lules del fetus, en especial al sistema immunitari i a les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques que estan en l'última fase del desenvolupament.

Per tant, la nostra hipòtesi és que la betametasona influeix en la incidència de la DT1, mitjançant modificacions en el desenvolupament tan del sistema immunitari prenatal com de la cèl·lula  $\beta$  pancreàtica i la interacció entre aquestes dos sistemes en la fase final de la gestació.



### 3. Objectius

L'objectiu general d'aquest estudi és determinar l'efecte de l'administració prenatal de betametasona sobre el risc de patir DT1 i identificar els mecanismes que alterin la susceptibilitat a desenvolupar la malaltia.

Els objectius concrets són:

1. Determinar l'efecte prenatal de la betametasona en la incidència de la DT1 en un model experimental de DT1 espontània, i elucidar com altera les cèl·lules responsables de l'atac autoimmune.
2. Caracteritzar l'acció de la betametasona sobre el fenotip i la funció de limfòcits i cèl·lules dendrítiques.
3. Avaluar els canvis en l'expressió gènica i els efectes metabòlics provocats per la betametasona a les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques.
4. Establir una relació preliminar entre el tractament prenatal amb betametasona en humans i la incidència de DT1 pediàtrica.

---

---

*Material i  
Mètodes*

---

---



## 4. Material i Mètodes

### 4.1 Reactius

La betametasona (Sigma, St. Louis, MO, EUA) va ser rehidratada utilitzant etanol 99,8% (EtOH, Alcoholes Gual S.A., Pacs del Penedès, Espanya), fins a tenir una concentració inicial de 5mg/mL. Per l'administració en ratolins va ser diluïda amb tampó fosfat salí (PBS, Oxoid Limited, Hampshire, Regne Unit) fins a la concentració de 0,5mg/ml. El PBS (Oxoid Limited) utilitzat com a control va ser preparat de la mateixa forma que la betametasona (Sigma) utilitzant EtOH (Alcoholes Gual S.A) de la mateixa puresa. Tot va ser conservat a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins al seu ús. Per a fer les dilucions necessàries per als experiments *in vitro* a partir de la concentració inicial es va utilitzar PBS.

La solució d'hemòlisi (SdH) va ser preparada utilitzant 140mM de clorur d'amoni ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Merck, Darmstadt, Alemanya) i 16,8mM Tris (Trizma Hydrochloride, Sigma) dissolts en aigua destil·lada. Posteriorment la solució va ser esterilitzada per calor.

El medi de cultiu R-10 va ser preparat utilitzant RPMI-1640 (Biowest, Nuaille, França) amb un 10% de sèrum boví fetal (SBF, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA). El Medi Complet (MC) va ser preparat amb RPMI-1640 (Biowest), 10% de SBF (ThermoFisher Scientific), 2mmol/L glutamina (Sigma), 1mmol/L piruvat sòdic (Thermo Fisher Scientific), 100U/mL penicil·lina (Normon SA, Madrid, Espanya), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  estreptomina (Laboratori Reig Jofre, St. Joan Despí, Espanya) i 25 $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma).

La col·lagenasa tipus IV (Sigma) va ser dissolta prèviament abans del seu ús. Es va utilitzar PBS filtrat per obtenir una concentració de 2mg/ml. Es va conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins a la seva utilització.

La solució d'inhibició (stop buffer) utilitzada en els tests d'ELISA Ready-Set-Go (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) va ser una solució d'àcid fosfòric ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 1M. Es van preparar 20mL de solució d'inhibició utilitzant els següents volums: 18,64mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destil·lada i 1,36mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% (Panreac, Montcada i Reixac, Espanya).

### 4.2 Model experimental: Ratolí No Obès Diabètic (NOD)

En aquest estudi s'han utilitzat ratolins del model NOD, soca singènica de ratolí que desenvolupa DMT1 de forma espontània i amb una història natural de la malaltia

molt similar a la que pateixen els humans, van ser establats en condicions SPF a l'estabulari de l'Institut Germans Trias i Pujol (IGTP, Badalona). La dieta utilitzada va ser una dieta estàndard per cria i manteniment (dieta Teklad 2918, Envigo, Indianapolis, IN, EUA) i aigua *ad libitum*. Els ratolins es van sotmetre a temperatura, humitat i cicles de llum de 12 hores controlats. Pels encreuaments es van emparellar un mascle i una femella per gàbia; el mascle va estar present durant tot l'embaràs i l'alletament de les cries fins a la seva separació. Per poder seguir l'embaràs, es va comprovar l'aparició de tap vaginal; el dia de detecció del tap es va considerar el dia E0.5. Per a l'estudi d'incidència es va administrar la betametasona per punxada intraperitoneal (i.p.) a les femelles gestants al dia E18.5 [betametasona (Sigma) 0,1mg] i de les femelles control [PBS (Oxoid Limited) + 10% de EtOH (Alcoholes Gual)] en un volum final de 200µL. Tant la betametasona (Sigma) com el PBS (Oxoid Limited) van ser preparats amb antelació i administrats amb xeringues de 0,5ml (29G). Les cries van ser separades dels progenitors 21 dies després del seu naixement. L'estudi va ser dut a terme de forma estricta sota la normativa d'ús i cura d'animals de laboratori de la Generalitat de Catalunya i els protocols es van aprovar pel Comitè Institucional per la Cura i Ús dels Animals d'Experimentació de l'IGTP (permís DMA 8948). L'estudi va seguir els principis bàsic marcats en la declaració d'Helsinki per a l'experimentació animal.

### 4.3 Determinació de la incidència de diabetis mellitus tipus 1

Per determinar la incidència de DMT1 en ratolins NOD es van fer controls diaris de glucosa en orina a partir de la setmana 10 d'edat, fins a la setmana 25. Per obtenir l'orina es va fer un massatge pèlvic per a aconseguir la micció d'una gota que va ser recollida amb una tira reactiva (CHROMA2, A. Menarini Diagnostics, Barcelona, Espanya). En cas de donar positiu es va fer un control de glicèmia en sang sense dejuni (AccuCheck, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA), considerant diabètics aquells ratolins amb una glicèmia superior a 300mg/dl. Els ratolins diabètics van ser eutanasiats. Es va extreure el pàncrees, el timus i la sang (per punció cardíaca) i es van congelar els òrgans a -80°C. Els ratolins que van arribar a fi d'estudi (25 setmanes) sense desenvolupar DT1 també van ser eutanasiats per a poder extreure pàncrees, timus i sang.

La incidència de la malaltia en la colònia control de ratolins NOD de l'IGTP va ser d'entre el 60-80% en femelles i del 20-30% en mascles en condicions SPF en el període d'estudi.

## 4.4 Teixits murins

### 4.4.1 Melsa

Es va utilitzar la melsa per a l'obtenció d'esplenòcits per als assajos *in vitro*. Per a l'obtenció de melsa, ratolins NOD no tractats d'entre 6 i 10 setmanes d'edat es van eutanasiar per dislocació cervical; un cop sacrificats es va extirpar la melsa que es va dipositar en sèrum fisiològic a 4°C per al seu transport fins al laboratori on es va processar.

### 4.4.2 Fèmur i tíbia

Es van obtenir els ossos llargs per utilitzat cèl·lules precursors del moll d'os per a diferenciar-les a DCs. Per l'obtenció de fèmur i tíbia, els ratolins NOD d'entre 10 i 25 setmanes de vida van ser sacrificats per dislocació cervical. Amb l'ajuda d'unes tisores i unes pinces es va netejar tot el teixit unit als ossos. Per a separar els ossos de la pelvis es va dislocar el fèmur de la pelvis i el peu de la tibia. Fèmur i tibia van ser dipositats en sèrum fisiològic a 4°C per al seu transport fins al laboratori on es va processar la mostra.

### 4.4.3 Criopreservació de sèrum, pàncrees i timus

Per a l'obtenció de sèrum, pàncrees i timus, els ratolins van ser anestesiats utilitzant Isoflurà (Forane®, AbbVie Farmacèutica, Madrid, Espanya). Un cop perdut el reflex pedal i el reflex palpebral, es van immobilitzar per a poder practicar una incisió abdominal fins a l'altura de l'estèrnum. Seguidament amb unes tisores es van tallar les costelles i diafragma per deixar el cor al descobert. Amb una xeringa d'insulina (29-30G) es va perforar el cor per accedir al ventricle dret, on es va aspirar amb suavitat per obtenir la sang (entre 0,5mL i 1mL de sang per ratolí) i es va dipositar en un eppendorf i es va deixar d'1 a 3 hores coagulant abans de centrifugar a 2750xg durant 5'. El sobrenedant obtingut es va congelar a -80°C. Un cop feta l'extracció de sang, amb l'ajuda d'unes pinces es va extirpar tant el pàncrees com el timus del ratolí, que es van congelar immediatament en un bany d'isopentà (2-metilbutà, Merck) en acetona (QCA, Química Clínica Avanzada S.A., Amposta, Espanya) amb neu carbònica. Per l'anàlisi de les subpoblacions limfocitàries en el timus, després d'extirpar-lo es va guardar en PBS+2%SBF a 4°C per a la seva posterior disgregació mecànica.

### 4.4.4 Illots pancreàtics

Per a l'obtenció d'illots pancreàtics (Anderson et al., 1999), els ratolins van ser eutanitzats per dislocació cervical. Seguidament es van immobilitzar per a poder practicar una incisió abdominal fins a l'altura de l'estèrnum. Es va pinçar l'ampolla

de Vàter amb unes tisores Halsted per evitar el reflux cap a l'intestí de la col·lagenasa tipus IV (Sigma). Amb l'ajuda de dues pinces es va netejar amb compte el colèdoc de tot el greix que sigui possible per a facilitar la canulació amb la xeringa. Es va carregar una xeringa amb 2mL de col·lagenasa freda i es va utilitzar una agulla de 30G que prèviament s'haurà doblegat en un angle de 90 graus aproximadament. Amb l'ajuda d'unes pinces per aguantar el colèdoc, es va canul·lar amb la xeringa i es va injectar la solució de col·lagenasa tipus IV (Sigma). Durant la perfusió es va observar com el pàncrees va augmentar de volum a causa de la distribució de la col·lagenasa tipus IV (Sigma) per l'òrgan, en cas contrari es va tornar a internar canul·lar el colèdoc. Un cop injectat els 2mL de solució de col·lagenasa tipus IV (Sigma), es va extirpar el pàncrees amb compte de no perforar-lo i de no extreure ni melsa ni greix en excés. Es va incubar el pàncrees a 37°C durant 30 minuts utilitzant un bany tèrmic. Es va aturar la reacció afegint 15mL de RPMI fred i es va disgregar mecànicament amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur. La majoria de teixit exocrí quedarà disgregat, es va deixar 2 minuts per a que sedimentin els illots i es va descartar el sobrenedant utilitzant una pipeta. Es va diluir el botó cel·lular amb 3mL de R-10, seguidament es va transferir tot el volum en 1 o 2 plaques de Petri. Es van recollir els illots manualment amb l'ajuda d'una lupa binocular i una pipeta, es van distribuir entre 30-40 illots per pou en plaques de 24 pous amb 1mL de MC. Es va estimular per 48 hores un dels pous amb 100nM de betametasona mentre que l'altre va ser el control. Passat aquest temps es va recollir el sobrenedant i es va congelar a -20°C, la resta es va descartar. Els illots pancreàtics enganxats al pou es van dissoldre utilitzant el tampó RLT del RNeasy micro Kit (Qiagen), la placa es va segellar i es va guardar a -80°C fins a la seva utilització per a l'extracció de RNA (protocol 4.16).

### 4.5 Histologia de l'òrgan diana

Es van obtenir crioseccions pancreàtiques de 5µm de gruix dels pàncrees de ratolins que van arribar a fi d'estudi (25 setmanes d'edat i no diabètics). La presència d'illots es va comprovar mitjançant la tinció de blau de metilè (Merck). En cas d'observar algun illot, es va recollir el tall consecutiu en un portaobjectes, es van descartar 5 talls i es va agafar el tall següent en el mateix portaobjectes fins a un màxim de 6 talls per portaobjectes. Entre portaobjectes es van deixar 10-20 talls i es va tornar a comprovar la presència d'illots; en cas de trobar nous illots es va repetir el procés anterior. A continuació, es van assecar els portaobjectes a l'aire durant 30 min i es van congelar a -80°C fins al dia de la seva tinció.

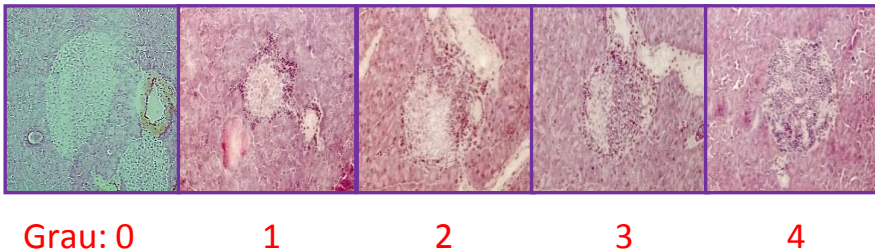
#### 4.5.1 Tinció Hematoxilina/Eosina

Es van descongelar les mostres i es van deixar assecar a l'aire durant 30 min. Per la tinció, es van tractar seqüencialment les mostres durant 3 min amb hematoxilina (Merck), 10s en aigua, 30s en eosina (Merck), 10s en etanol (EtOH, Merck) 70%, 10s

en EtOH 90%, 2 min en EtOH 100% i per últim 1 min en Xilol. Finalment es van cobrir els portaobjectes amb medi de muntatge DPX (BDH Laboratory Supplies, Poole, Regne Unit) i un cobreobjectes.

#### 4.5.2 Determinació del grau d'infiltració limfocitària dels illots

Es van observar les mostres tenyides per Hematoxilina/Eosina (H/E) en un microscopi òptic per tal de determinar el grau d'insulitis en un mínim de 30 illots per animal. Es va assignar un valor del 0 al 4 a cadascun dels illots segons el grau d'infiltració leucocitària que presentaven; essent el 0 valor mínim i el 4 el valor màxim, segons el protocol habitual (Alba et al., 2004). Cada grau fa referència a un estadi d'infiltració leucocitària, sent el grau 0 un illot sa, grau 1 un illot amb periinsulitis, grau 2 un illot amb insulitis lleu (<25% d'infiltració), grau 3 un illot amb insulitis moderada (25-75% d'infiltració) i grau 4 un illot amb insulitis severa (>75% d'infiltració) (Figura 5). El grau d'insulitis es va determinar en funció d'una mitjana ponderada del total d'illots analitzats seguint la fórmula  $\frac{(0xA)+(1xB)+(2xC)+(3xD)+(4xE)}{n^{\circ} \text{ d'illots contats}}$  on A, B, C, D i E corresponen al nombre d'illots valorats en els diferents graus d'infiltració. La lectura es va realitzar per dos investigadors independents i amb els animals codificats per a no saber el grup de procedència.



**Figura 5. Graus d'insulitis de ratolins NOD.** Imatges (10X) obtingudes per microscopia òptica on es mostra el grau d'infiltració leucocitària dels illots pancreàtics d'una femella de ratolí NOD de 25 setmanes. D'esquerra a dreta: Grau 0 = no infiltració, grau 1 = periinsulitis, grau 2 = insulitis lleu (<25% d'infiltració), grau 3 = insulitis moderada (25-75% d'infiltració) i grau 4 = insulitis severa (>75% d'infiltració). Les imatges mostrades són un exemple representatiu del criteri que s'ha seguit per a la determinació del grau d'insulitis present en els ratolins tractats en aquest estudi. Imatges cedides per Rodríguez-Fernandez, S. (2013).

#### 4.6 Obtenció d'esplenòcits

Es van obtenir els esplenòcits per disgregació mecànica de la melsa. Es van utilitzar plaques de 24 pous estèrils (SPL Life Sciences Co, Naechon-Myeon, Corea del Sud) amb 1mL de R-10 per a disgregar la melsa amb l'èmbol d'una xeringa estèril de 2mL com a morter. Un cop obtinguda, la suspensió cel·lular es va passar a tubs de 15mL i es va netejar el pou 2 vegades amb R-10, es va deixar sedimentar la suspensió 2



minuts per a precipitar les restes de teixit, es va agafar el sobrenedant, es va passar a un tub de 15mL i es va centrifugar a 400xg durant 5 min a temperatura ambient (TA). Es van llisar els eritròcits utilitzant SdH, durant 5 min i després es va bloquejar l'hemòlisi amb R-10. Es va centrifugar a 400xg 5 min descartant el sobrenedant, es va fer un rentat amb R-10 i es va tornar a centrifugar amb les mateixes condicions que a l'inici, 400xg durant 5 min a TA. El botó cel·lular es va resuspendre en 5ml de MC i per finalitzar, es va fer un recompte i control de la viabilitat mitjançant citometria de flux (FacsCanto II, BD Bioscience, New Jersey, EUA). Amb aquesta finalitat, 10µL de solució de cèl·lules es van tenyir amb 2µL d'annexina V (AnnV) ficoeritrina (PE) (Immuno Tools, Friesoythe, Alemanya), 2µL de 7-aminoactinomicina D (7-AAD, BD Bioscience, New Jersey, EUA) i 46µL de solució de Ca<sup>2+</sup> (BD Bioscience) durant 15 min i es van afegir 10µL de microesferes Perfect Count (Cytognos SL, Salamanca, Espanya) per a poder fer el comptatge cel·lular. Les cèl·lules obtingudes es van cultivar *in vitro* per a la realització d'experiments.

### 4.7 Determinació de poblacions limfocitàries de ratolins nounats

Per determinar els canvis induïts per la betametasona en el sistema immunitari dels ratolins nounats es van quantificar les subpoblacions després de l'administració de betametasona. Es va ajustar el dia del tractament per a realitzar-lo el dia abans del part (E20,5). Les cries van ser sacrificades a dia 1 (d1) i a dia 4 (d4) per a l'obtenció de melsa, timus i pàncrees (protocol 4.4). Els òrgans recollits van ser disgregats mecànicament amb l'ajuda de l'èmbol d'una xeringa per a obtenir una suspensió cel·lular. Es van recollir les cèl·lules i es van centrifugar a 400xg durant 5 minuts. Es va descartar el sobrenedant i es va realitzar un rentat amb PBS+2%SBF amb una centrifugació a 400xg durant 5 minuts. Es va descartar el sobrenedant i es va diluir el botó cel·lular en 500µL de PBS+2%SBF. Es va realitzar un comptatge i viabilitat de les suspensions cel·lulars obtingudes (protocol 4.6). Per al marcatge del fenotip es van utilitzar 5x10<sup>5</sup> cèl·lules per panell, es van utilitzar 3 panells diferents, 1 panell per a les cèl·lules del timus i 2 panells per a les cèl·lules de la melsa. El timus es va marcar amb anti-CD3 efluor 450, anti-CD4 alo ficocianina-Cianina 7 (APC-Cy7), anti-CD8 ficoeritrina-cianina 7 (PE-Cy7), anti-CD25 PE, anti-CD44 alo ficocianina (APC) i anti-TCRγδ Complexa proteic de clorofil·la peridina-Cianina 5.5 (PercP-Cy5.5). La melsa es va marcar utilitzant per al panell T i B anti-CD4 APC, anti-CD8a PE-Cy7, anti-CD19 V450, anti-CD25 PE, anti-CD45 APC-Cy7 i anti-TCRαβ PercP-Cy5.5, per al panell de les polimorfonuclears es van utilitzar anti-CD3 violeta brillant 421 (BV421), anti-CD11b APC, anti-CD11c PE-Cy7, anti-CD45 APC-Cy7 i anti-Ly6G PercP-Cy5.5 (Taula 2). Es van incubar les cèl·lules durant 10 minuts a 4°C i fosc, es va afegir 50µL del marcatge de viabilitat Pacific Orange (ThermoFisher Scientific) i es van incubar 20 minuts més a 4°C i fosc. Acabada la incubació es van realitzar dos rentat amb

500uL de PBS+2%SBF centrifugant a 400xg durant 5 minuts, el botó cel·lular resultant es va diluir amb 100µL de PBS+2%SBF. Les cèl·lules es van adquirir per citometria de flux (FacsCanto II, BD Bioscience) i la seva anàlisi es va realitzar mitjançant el programa FlowJo vX (BD Bioscience, Ashland, OR, EUA).

**Taula 2. Panell d'anticossos utilitzat en l'estudi de subpoblacions en timus i melsa de ratolins nounats.** APC: Alo ficocianina; APC-Cy7: Alo ficocianina-Cianina 7; PE: Ficoeritrina; PE-Cy7: Ficoeritrina-Cianina 7; PercP-Cy5.5: Complexa proteic de clorofil·la peridina-Cianina 5.5.

Antigen	Fluorocrom	Isotip	Clon	[Ús] µg/mL	Casa Comercial
<b>Panell marcatge del timus</b>					
CD3	Efluor 450	Hàmster daurat IgG	500A2	1	eBioscience
CD4	APC-Cy7	Rata IgG2a, κ	RM4-5	0,2	eBioscience
CD8	PE-Cy7	Rata IgG2a, κ	53-6.7	0,2	eBioscience
CD25	PE	Rata IgG2b, κ	3C7	1	BioLegend
CD44	APC	Rata IgG2a, κ	IM7	0,2	eBioscience
TCRγδ	PercP-Cy5.5	Hàmster IgG	GL3	0,4	BioLegend
<b>Panell 1 marcatge melsa T i B</b>					
CD4	APC	Rata IgG2a, κ	RM4-5	2	BD Bioscience
CD8	PE-Cy7	Rata IgG2a, κ	53-6.7	0,2	eBioscience
CD19	V450	Rata IgG2a, κ	1D3	2	BD Bioscience
CD25	PE	Rata IgG2b, κ	3C7	1	BioLegend
CD45	APC-Cy7	Rata IgG2b	I3/2.3	0,5	eBioscience
TCRαβ	PercP-Cy5.5	Hàmster IgG	H57-597	2	BioLegend
<b>Panell 2 marcatge melsa polimorfonucleades</b>					
CD3	Efluor 450	Hàmster daurat IgG	500A2	1	eBioscience
CD11b	APC	Rata IgG2b, κ	M1/70	1,25	eBioscience
CD11c	PE-Cy7	Hàmster IgG1	HL3	1	BD Bioscience
CD45	APC-Cy7	Rata IgG2b	I3/2.3	0,5	eBioscience
Ly6G	PercP-Cy5.5	Rata IgG2a, κ	1A8	0,4	BD Bioscience

## 4.8 Determinació de les famílies Vβ del TCR

Per determinar els efectes de la betametasona en el repertori de famílies de la zona variable de la cadena β (Vβ) es van utilitzar esplenòcits de ratolins NOD de 6 setmanes d'edat. Un cop obtinguda la suspensió cel·lular d'esplenòcits (apartat 4.6)

es van marcar  $10^6$  cèl·lules per a cada família de V $\beta$ . Per a realitzar el marcatge es va utilitzar el kit “Anti-Mouse TCR V $\beta$  Screening Panel” (BD bioscience). A més, es va afegir els anticossos anti-CD3 eFlour 450 (eBioscience, San Diego, CA, EUA), anti-CD4 APC eFlour 780 (eBioscience), anti-CD8a PE-Cy7 (eBioscience), anti-CD25 PE (Biolegend, San Diego, CA, EUA) (Taula 3) i Pacific Orange (Invitrogen) a cada marcatge de família V $\beta$ . Les cèl·lules es van marcar 10 min a TA amb la barreja d’anticossos, es va afegir 2 $\mu$ g de Pacific Orange (Invitrogen) a cada tub com a marcador de viabilitat i es va incubar 20 min a 4°C. Els tubs es van centrifugar a 400xg 5 min, es va descartar el sobrenedant i es va afegir 100  $\mu$ L de PBS. Les cèl·lules es van adquirir per citometria de flux (FacsCanto II, BD Bioscience) i la seva anàlisi es va realitzar mitjançant el programa FlowJo vX (BD Bioscience, Ashland, OR, EUA).

**Taula 3. Panell d’anticossos utilitzats per la detecció de les famílies V $\beta$ .** APC: Alo ficocianina; PE: Ficoeritrina; PE-Cy7: Ficoeritrina-Cianina 7

Antigen	Fluorocrom	Isotip	Clon	[Ús] ( $\mu$ g/ml)	Casa comercial
CD3	eFlour 450	Hàmster daurat IgG	500A2	8	eBioscience
CD4	APC eFlour 780	Rata IgG2a, K	RM4-5	0,8	eBioscience
CD8a	PE-Cy7	Rata IgG2a, K	53-6.7	0,6	eBioscience
CD25	PE	Rata IgG2b, K	3C7	4	Biolegend

## 4.9 Assaig de toxicitat

Els esplenòcits obtinguts per disgregació mecànica (protocol 4.6) van ser cultivats *in vitro* en plaques de 96 pous de fons pla (Thermo Fisher Scientific) en una concentració de  $2 \times 10^6$  cèl·lules/mL, utilitzant MC i diferents concentracions de betametasona (Sigma) (0,1nM, 1nM, 2,5nM, 5nM, 10nM, 50nM, 100nM i 1000nM) a l’incubador a 37°C i 5% CO $_2$ . Passades 24h es van recuperar els esplenòcits de cada pou en tubs de citometria, es van centrifugar 5 min a 400xg a TA per a eliminar el sobrenedant, es van resuspendre amb el marcatge de viabilitat [2 $\mu$ L de AnnV PE (ImmunoTools), 2 $\mu$ L de 7-AAD (BD Bioscience), 46 $\mu$ L de solució de Ca $^{2+}$  (BD Bioscience)] i es van incubar 20 min a TA en fosc. Les cèl·lules es van adquirir mitjançant citometria de flux (FacsCanto II, BD Bioscience) i la seva anàlisi es va realitzar mitjançant el programa FlowJo vX (BD Bioscience).

## 4.10 Assaig de proliferació

Els esplenòcits obtinguts per disgregació mecànica van ser marcats utilitzant carboxifluoresceïna di-acetat succinimidil ester (CFDA-SE, Thermo Fisher Scientific). Aquesta molècula pot entrar a l'interior de les cèl·lules on serà metabolitzada i perdrà el di-acetat, transformant-se en carboxifluoresceïna succinimidil ester (CFSE), que té gran capacitat per unir-se a les proteïnes de l'interior cel·lular i emet de forma similar a la fluoresceïna (FITC). Per realitzar el marcatge les cèl·lules van ser rentades amb PBS a TA i centrifugades a 400xg per 5 min. El marcatge es va realitzar a una concentració de  $5 \times 10^6$  cèl·l/ml amb 312,5nM de CFSE durant 10 min a TA i en fosc. Es va aturar el marcatge utilitzant R-10 i es va centrifugar a 400xg per 5 min. Es va descartar el sobrenedant, es va resuspendre el botó cel·lular amb 3ml de R-10 i es va incubar durant 15 min a 37°C en el bany per a metabolitzar el CFDA-SE en CFSE. Es va centrifugar a 400xg per 5 min i rentar amb R-10. El botó cel·lular es va resuspendre en 2ml de medi complet, es va fer un comptatge i determinació de la viabilitat per citometria de flux, tal com s'ha detallat en l'apartat anterior (protocol 4.6). Finalment, les cèl·lules es van cultivar en una placa de 96 pous de fons rodó (SPL Life Sciences Co) a una concentració de  $1 \times 10^6$  cèl·l/ml en MC, juntament amb betametasona (Sigma) (25nM, 5nM i 1nM), mitògens d'elecció: forbol 12-miristat 13-acetat (PMA, Sigma) (25ng/ml) i Ionomicina (IO, Sigma) (250ng/ml), en un volum de 200µL per pou. A més, es van realitzar controls sense mitogen per a cada concentració de betametasona (Sigma) diferent. El cultiu es va mantenir 72 hores a l'incubador a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Passat aquest temps es van recollir 100µL de sobrenedant de cada pou i es van congelar a -80°C. Les cèl·lules es van marcar amb anticossos anti-CD3 V450 (BD Bioscience) i anti-CD19 PE (BD Bioscience) (Taula 4), i amb 7-AAD (BD Bioscience) per determinar la viabilitat. Les cèl·lules es van adquirir per citometria de flux (FacsCanto II, BD Bioscience) i la seva anàlisi es va realitzar mitjançant el programa Flowjo vX (BD Bioscience, Ashland, OR, EUA).

**Taula 4. Panell d'anticossos utilitzats per l'assaig de proliferació en esplenòcits.** PE: Ficoeritrina.

Antigen	Fluorocrom	Isotip	Clon	[Ús] (µg/ml)	Casa comercial
CD3	V450	Hàmster daurat IgG2, κ	500A2	2	BD Bioscience
CD19	PE	Rata IgG2a, κ	1D3	2	BD Bioscience

## 4.11 Generació de cèl·lules dendrítiques

Un cop es va extreure el fèmur i la tibia del ratolí, com s'especifica a l'apartat 4.4.2, es va preparar una placa estèril de 6 pous amb la següent disposició: pou 1, 3mL de MC; pou 2, 3mL d'EtOH (Alcoholes Gual S.A.) 70%; pou 3, 3mL R-10; pou 4, 1mL de MC. Els ossos es van dipositar al pou 1 per eliminar el màxim de teixit i per dislocar fèmur de la tibia. Es van passar els ossos al pou 2 durant 10-15s. Passat el temps es van introduir al pou 3 per eliminar l'excés d'etanol, es van tallar els extrems dels ossos i es va perfondre l'os sobre el pou 4 amb una xeringa (agulla de 30G) de 10mL amb MC o R-10. Es va recollir el medi del pou 4 en un tub de 15mL, es va centrifugar a 400xg durant 5 min a TA i es va descartar el sobrenedant. Es va resuspendre el botó cel·lular en 5mL de SdH, es va incubar 5 min a TA. Es va aturar l'hemòlisi utilitzant R-10 en excés, es va centrifugar a 400xg durant 5 min i es va descartar el sobrenedant. Després de fer un rentat amb R-10 es va resuspendre en 1-2mL de MC i es va realitzar una anàlisi de viabilitat i comptatge cel·lular, tal com s'ha detallat en l'apartat anterior (protocol 4.6). Es van deixar les cèl·lules a una concentració de  $1 \times 10^6$  cèl·lules/mL, es va addicionar factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF, Prospecbio, Rehovot, Israel) a concentració de 1000U/mL i es va sembrar 1mL per pou en una placa de 24 pous. Es van sembrar 5 pous, un per a cada diferent condició experimental (Immadures, madures, betametasona [10nM, 100nM, 1000nM]). A dia 3 es va fer un canvi de medi, es va descartar 500µL de sobrenedant del pou i es va afegir 500µL de MC suplementat [MC + 10% SBF + 2mmol/L glutamina + 1mmol/L piruvat sòdic + 2000U/mL factor d'estimulació de colònies de granulòcits i macròfags (GM-CSF (Prospecbio))] i els diferents estímuls de betametasona (Sigma) (10nM, 100nM i 1000nM) als pous corresponents. A dia 5 es va resuspendre cada pou i es van dividir en 2 pous. Es va afegir 500µL de MC suplementat a tots els pous, es va afegir els diferents estímuls de betametasona (Sigma) als pous corresponents. A dia 7, es van descartar 500µL de sobrenedant i es va afegir 500µL de MC suplementat juntament amb els diferents estímuls de betametasona (Sigma) als pous corresponents. Igualment, a dia 8 es va fer un canvi del 50% del medi utilitzant MC suplementat amb menor concentració de GM-CSF [MC + 10% SBF + 2mmol/L glutamina + 1mmol/L piruvat sòdic + 1000U/mL GM-CSF (Prospecbio)]; no es va afegir betametasona (Sigma). Les DCs es van estimular amb 100ng/mL de Lipopolisacàrid (LPS, Sigma) les últimes 24 hores de cultiu o amb 1µg/mL illes CpG les últimes 48 hores per generar DCs madures (mDCs). Les DCs diferenciades amb betametasona també van ser estimulades amb LPS o illes CpG per generar DCs madures diferenciades amb betametasona (betDCs) a diferents concentracions: 10nM de betametasona (10betDCs), 100nM de betametasona (100betDCs) o 1000nM de betametasona (1000betDCs).

## 4.12 Anàlisi del fenotip de les cèl·lules dendrítiques

Un cop diferenciades les DCs a partir de precursors de moll d'os, es va recollir el sobrenedant de la placa en tubs de 15ml, es va centrifugar a 400xg 5 min i es va congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Per altra banda el botó cel·lular es va resuspendre en 500 $\mu\text{L}$  de MC. Es van fer 2 rentats amb RPMI-1640 (Biowest) a la placa i es va passar el sobrenedant als tubs de 15mL. Es va afegir 500 $\mu\text{L}$  d'Accutasa (eBioscience) i es va mantenir durant 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ , passat el temps es va resuspendre per desenganxar les cèl·lules i es va passar al tub de 15mL corresponent. Es van fer 2 rentats a la placa amb RPMI-1640 (Biowest), es va centrifugar els tubs de 15mL a 400xg per 5 min i es va descartar el sobrenedant. Es va resuspendre el botó cel·lular en 130 $\mu\text{L}$  de MC/50 (50%MC + 50% RPMI-1640 (Biowest)). Es va repartir el volum en 3 alíquotes: per la tinció de viabilitat es va utilitzar 7-AAD (BD Bioscience), AnnV PE (ImmunoTools) i CD11c PE-Cy7 (BD Bioscience), pel fenotip 1 es va utilitzar CD11c PE-Cy7 (BD Bioscience), CD86 PE (eBioscience) i CD40 APC (BD Bioscience) i pel fenotip 2 es va utilitzar CD11c PE-Cy7 (BD Bioscience), CD25 PE (eBioscience), MHC classe I eFluor450 (eBioscience) i MHC classe II APC (eBioscience) (Taula 5), juntament amb les corresponents fluorescències menys un (FMO) per a cada tinció. Les cèl·lules es van adquirir per citometria de flux (FacsCanto II, BD Bioscience) i la seva anàlisi es va realitzar mitjançant el programa Flowjo vX (BD Bioscience).

**Taula 5. Panell d'anticossos utilitzats en l'experiment de fenotipatge de les cèl·lules dendrítiques generades amb betametasona.** APC: Alo ficocianina; PE: Ficoeritrina; PE-Cy7: Ficoeritrina-Cianina 7.

Antigen	Fluorocrom	Isotip	Clon	[Ús] ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Casa comercial
CD11c	PE-Cy7	Hàmster armeni, IgG1	HL3	1	BD Bioscience
CD25	PE	Rata IgG1, $\lambda$	PC61.5	2	eBioscience
CD40	APC	Rata IgG2a, $\kappa$	3/23	2	BD Bioscience
CD86	PE	Rata IgG2a, $\kappa$	GL1	0,2	eBioscience
MHC I	eFluor450	Ratolí IgG2a	SF1-1.1.1	2	eBioscience
MHC II	APC	Rata IgG2b, $\kappa$	AMS-32.1	2	eBioscience

### 4.13 Assaig de proliferació induïda per les cèl·lules dendrítiques

A dia 8 del protocol d'obtenció de cèl·lules dendrítiques de moll d'os (protocol 4.11), juntament amb el canvi de medi es va afegir insulina porcina (Sigma, 20 µg/mL) i es va mantenir 2 hores en cultiu abans d'afegir el LPS o les illes CpG per a madurar les cèl·lules. El mateix dia es van marcar esplenòcits d'un ratolí de la mateixa soca amb CFSE (protocol 4.10) i es van plaquejar en una placa de 96 pous (SPL Life Technologies) a una concentració de  $5 \times 10^5$  cèl·lules/mL. Es van fer triplicats de set condicions: immadures, madures, betametasona (Sigma) [10nM, 100nM, 1000nM], MC i PMA+IO i es van cultivar a l'incubador a 37°C 5%CO<sub>2</sub>. A dia 9 es va fer l'anàlisi del fenotip segons l'apartat anterior (apartat 4.12) afegint un comptatge amb microesferes Perfect Count (Cytognos SL) al tub de viabilitat; es van posar 10.000 DCs per pou (Ratio final 10:1) excepte a les condicions MC i PMA+IO (Sigma). El cultiu es va deixar 96 hores a l'incubador a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> i posteriorment es va recollir 100µL de sobrenedant de cada pou i es va guardar a -80°C. Les cèl·lules van ser marcades amb els anticossos anti-CD3 V450 (BD Bioscience), anti-CD19 PE (BD Bioscience), anti-CD4 APC-Cy7 (BD Bioscience), anti-CD8 V500 (BD Bioscience) i anti-TCRγδ PE-Cy7 (BioLegend) (Taula 6) i amb 7-AAD (BD Bioscience) per determinar la viabilitat. Les cèl·lules es van adquirir per citometria de flux (FacsCanto II, BD Bioscience) i la seva anàlisi es va realitzar mitjançant el programa Flowjo vX (BD Bioscience).

**Taula 6. Panell d'anticossos utilitzats en l'experiment de proliferació autòloga de esplenòcits amb cèl·lules dendrítiques generades amb betametasona.** PE: Ficoeritrina; APC-Cy7: Alo ficocianina-Cianina 7; PE-Cy7: Ficoeritrina-Cianina 7.

Antigen	Fluorocrom	Isotip	Clon	[Ús] (µg/ml)	Casa comercial
CD3	V450	Hàmster daurat IgG2, κ	500A2	2	BD Bioscience
CD4	APC-Cy7	Rata IgG2b, κ	GK1.5	2	BD Bioscience
CD8	V500	Rata IgG2a, κ	53-6.7	2	BD Bioscience
CD19	PE	Rata IgG2a, κ	1D3	2	BD Bioscience
TCRγδ	PE-Cy7	Hàmster armeni IgG	GL3	0,8	BioLegend

#### 4.14 Efectes de la betametasona sobre les cèl·lules $\beta$

Per determinar l'efecte de la betametasona en la cèl·lula diana de la DT1 es va utilitzar la línia cel·lular NIT-1. Aquesta línia va ser establerta a partir d'un insulinoma d'un ratolí de la soca NOD/Lt (Hamaguchi et al., 1991) i va ser escollida per la seva semblança en els autoantígens de la cèl·lula  $\beta$  (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA). Les cèl·lules NIT-1 van ser cultivades amb diferents concentracions de betametasona per tal d'avaluar l'efecte d'aquest fàrmac sobre la cèl·lula beta. Per determinar els efectes sobre la viabilitat i l'expressió de molècules de membrana,  $5 \times 10^5$  cèl·lules NIT-1 van ser cultivades durant 48h amb MC en plaques de 6 pous per permetre la formació d'una monocapa. Passades 48h es va realitzar un canvi de medi del 100% i es va afegir concentracions creixents de betametasona (Sigma), des de 10nM fins a  $10 \mu\text{M}$ ; es va incloure un control sense betametasona. A les 48h es va recollir 1mL de sobrenedant que es va congelar a  $-20^\circ\text{C}$ . Es va rentar el pou amb 1mL de RPMI (Biowest) sense proteïna. Un cop descartat el RPMI (Biowest) es va afegir 500 $\mu\text{L}$  de tripsina-EDTA 0,05% (ThermoFisher Scientific), es va incubar 1 min a  $37^\circ\text{C}$ , es van desenganxar suaument les cèl·lules amb la pipeta i es van resuspendre en 3mL de R-10. Per determinar la mediana de la intensitat de fluorescència (MFI) i la viabilitat, es van centrifugar les cèl·lules, es va resuspendre el botó cel·lular en 200 $\mu\text{L}$  de PBS (Oxoid), es van agafar 10 $\mu\text{L}$  de cèl·lules i es van marcar durant 20 min a TA amb anti-CD44 BV786, anti-MHC classe I efluor 450, Ann V PE i 7-AAD (BD Bioscience). Les corresponents FMO van ser utilitzades com a control del marcatge. Abans de l'adquisició es van afegir 10 $\mu\text{L}$  de microesferes Perfect Count (Cytognos) per calcular el nombre total de cèl·lules al cultiu. L'adquisició es va realitzar utilitzant un LSR Fortessa (BD bioscience). El volum sobrant es va transferir a un eppendorf i es va centrifugar a 2000xg 5 min, es va descartar el sobrenedant i es va resuspendre el botó cel·lular en 500 $\mu\text{L}$  de PBS (Oxoid). Seguidament, es va centrifugar a 16000xg 5 min, es va descarta el sobrenedant i es va congelar el botó cel·lular a  $-80^\circ\text{C}$  per a la posterior extracció de RNA.

Per avaluar la capacitat d'expansió de les cèl·lules NIT-1 es van cultivar  $4 \times 10^6$  NIT-1 amb MC suplementat amb 100nM de betametasona (Sigma). Cada 2-3 dies es va efectuar un canvi de les cèl·lules a un nou flascó, les cèl·lules es van rentar amb RPMI prèviament a afegir 1mL de tripsina-EDTA 0,05% (ThermoFisher Scientific) i es van incubar 1 min a  $37^\circ\text{C}$ . Finalment, es va aturar la reacció afegint R-10. Les cèl·lules es van rentar i es va realitzar un comptatge cel·lular i determinació de la viabilitat amb 10 $\mu\text{L}$  de cèl·lules. Per observar si l'efecte de la betametasona era reversible, al cap de 10 dies es va retirar la betametasona (Sigma) del cultiu tractat i es va cultivar únicament amb MC. Es van anar realitzant canvis de flascó amb comptatge de cèl·lules i determinació de la viabilitat, com s'ha mencionat prèviament, fins que el



cultiu va arribar a la fase exponencial de creixement moment en què es va considerar que les cèl·lules NIT-1 havien recuperat la seva capacitat d'expansió.

### 4.15 ELISA

Per a la determinació de la concentració de les diferents citocines presents en els cultius de cèl·lules NIT-1, de DCs i en l'assaig de proliferació autòloga es van utilitzar els kits Ready-Set-Go (Invitrogen) per a la determinació d'IL-17, d'IL-6, d'IL-10, del TNF $\alpha$  i del factor de creixement transformador  $\beta$  (TGF $\beta$ ). Es van utilitzar les mostres prèviament congelades corresponents a cada tipus d'experiment (apartats 4.11 i 4.13). L'experiment es va realitzar seguint les instruccions del fabricant. Es va utilitzar plaques MaxiSorp (Nunc, Denmark) per a maximitzar l'absorció de les proteïnes. El primer pas va ser fer el recobriment de la placa amb 100 $\mu$ L d'anticòs de captura amb "overnight" a 4 $^{\circ}$ C, l'endemà es va fer 3 rentats de la placa amb PBS 0,05% tween 20, es va bloquejar els pous amb tampó de dilució durant 1 hora a TA per evitar unions inespecífiques. Es va preparar la corba estàndard i les dilucions de les mostres en els casos necessaris. Es va fer un rentat amb PBS 0,05% de tween20, es van afegir les mostres i l'estàndard a la placa i es va deixar "overnight". Es va rentar la placa 5 cops amb PBS 0,05% tween20 i es va afegir 100 $\mu$ L d'anticòs de detecció conjugat amb estreptavidina incubant 1 hora a TA. Es van fer 5 rentats amb PBS 0,05% tween20 i es va afegir 100 $\mu$ L d'avidina conjugada a la peroxidasa del rave (HRP) durant 30 minuts a TA. Es van realitzar 7 rentats més amb PBS 0,05% tween20 i es van afegir 100 $\mu$ L de tetrametil benzidina (TMB), substrat de l'enzim HRP (dóna un color blavós), durant 15 minuts. Per a aturar la reacció es va utilitzar 50 $\mu$ L de la solució d'inhibició, solució àcida que inactiva l'enzim i fa canviar a color groc la TMB que ha sigut processada per l'enzim. La lectura de l'absorbància de les plaques es va efectuar amb Varioskan (ThermoFisher Scientific) a 450nm i 570nm de longitud d'ona. El resultat final és la resta de l'absorbància a 450nm menys l'absorbància a 570nm. La sensitivitat i la corba estàndard és la següent per als diferents ELISAs: IL-17 sensitivitat 4pg/mL, corba estàndard 4-500pg/mL; IL-6 sensitivitat 4pg/mL, corba estàndard 4-500pg/mL; IL-10 sensitivitat 32pg/mL, corba estàndard 32-4000pg/mL i TNF $\alpha$  sensitivitat 8pg/mL, corba estàndard 8-1000pg/mL.

En el cas de l'ELISA per quantificar TGF $\beta$ , el protocol és el mateix que l'anterior però les mostres s'han d'inactivar prèviament utilitzant 20 $\mu$ L d'àcid clorhídric (HCl) 1M per cada 100 $\mu$ L de mostra. Posteriorment s'incuba 10 minuts a TA. Per tornar al Ph normal de la mostra s'haurà d'afegir 20 $\mu$ L d'hidròxid de sodi (NaOH) 1M. Un cop inactivades les mostres es plaquejen i es finalitza el protocol de l'ELISA com s'ha explicat en el paràgraf anterior. La sensitivitat del kit d'ELISA per quantificar el TGF $\beta$  és de 8pg/mL i el rang de la corba estàndard és de 8-1000pg/mL.

Per a la determinació de la concentració de pèptid C en el sobrenedant es va utilitzar un kit d'Elisa (Raybiotech, Norcross, GA, USA). Aquest ELISA és competitiu, és a dir,

el pèptid C de les mostres competirà per la unió amb l'anticòs amb una concentració coneguda de pèptid C biotinitat que afegirem a cada pou de la placa d'ELISA. Es van utilitzar les mostres prèviament congelades en els experiments d'efectes in vitro de la betametasona (protocol 4.14). L'experiment es va realitzar seguint les instruccions del fabricant. La placa ja ve amb un anticòs conjugat anti-IgG, per tant el primer pas va ser afegir als pous 100µL de anti-pèptid C que servirà d'anticòs de captura i incubar 1,5 hores amb agitació molt suau (1-2 cicles/segon) a TA. Es van preparar les mostres fent una dilució 1/2 amb 125µL de mostra i 125µL de pèptid C biotinitat per a tenir un volum final de 250µL. Acabada la incubació es va fer 4 rentats amb tampó de rentat 1X. Es van dispensar 100µL dels estàndard, del control positiu, de les mostres diluïdes i un blanc amb diluent de l'assaig i es va deixar tota la nit a 4°C sense agitació. Es van realitzar 4 rentats amb tampó de rentat 1X. Es van afegir 100µL de solució d'estreptavidina-HRP a cada pou i es va incubar 45 minuts amb una agitació suau. Es van realitzar 4 rentats amb tampó de rentat 1X. Es va afegir 100µL de TMB a cada pou durant 30 minuts amb agitació suau i en foscor; per aturar la solució es va afegir 50µL de solució d'inhibició (àcid sulfúric 0,2M) i es va homogeneïtzar bé els pous. Per finalitzar la lectura de l'absorbància es va realitzar en Varioskan (ThermoFisher Scientific) a una longitud d'ona de 450nm. Per a calcular la concentració de pèptid C es va utilitzar un percentatge d'absorbàncies (B/B<sub>0</sub>), on B = Absorbància mostra o estàndard – blanc i B<sub>0</sub> = Absorbància unió total – blanc.

#### 4.16 Extracció de RNA

Per a l'extracció de RNA es va utilitzar el kit RNeasy micro (Qiagen, Hilden, Germany) seguint les recomanacions del fabricant. Aquest sistema utilitza una columna amb una membrana de sílice per tal d'atrapar el RNA o DNA i posteriorment permetre la seva fàcil elució. Es van utilitzar pàncrees de les cries de ratolí (apartat 4.7), els botons cel·lulars congelats provinents de la línia cel·lular NIT-1 (apartat 4.14) i els illots pancreàtics de NOD prèviament dissolts i congelats amb tampó RLT (Qiagen) (apartat 4.4.4). Els primers passos depenen del tractament que necessiti la mostra. Per als botons cel·lulars congelat a -80°C es va afegir en fred 350µL de tampó de lisis (RLT) per tal de dissoldre el botó cel·lular, seguidament es van afegir 3,5µL de β-mercaptoetanol. Si la mostra és un pàncrees sencer, afegirem els 350µL de tampó RLT i disgregarem mecànicament el pàncrees amb l'ajuda de la pipeta alternant amb vòrtex de 5 segons, un cop hem aconseguit dissoldre tot el pàncrees afegirem 3,5µL de β-mercaptoetanol. En les mostres d'illots, degut a que ja es va congelar directament amb el tampó RLT, es va descongelar la placa en fred. Un cop descongelada es va recollir el tampó RLT en un eppendorf i es van afegir 3,5µL de β-mercaptoetanol. Passat aquest punt el protocol és el mateix independentment de les mostres. Es va realitzar un vòrtex de 20 segons. Un cop la mostra va estar homogeneïtzada es va afegir 5µL de transportador de RNA (concentració 4ng/µL) i es va afegir 350µL d'EtOH 70% (Alcoholes Gual S.A). Es va homogeneïtzar la mostra

amb pipeta per evitar els agregats de DNA, es van transferir 700µL a la columna de retenció del RNA. Es va centrifugar la columna a 8000xg durant 15 segons per a atrapar el RNA a la membrana de sílice i el sobrenedant del tub de recollida es va descartar. Es va fer un rentat de la membrana de la columna amb 200µL de tampó RW1, es va centrifugar a 8000xg durant 15 segons i es va descartar el sobrenedant. Es va afegir 80µL de DNasa (10µL de DNasa 4ng/µL (Qiagen) + 70µL de tampó RDD (Qiagen)) per tal d'eliminar restes de DNA enganxats a la membrana i es va deixar incubant 15 minuts a TA. Es va fer un rentat amb 200µL de tampó RW1 centrifugant a 8000xg durant 15 segons i es va descartar el sobrenedant. Es va afegir 500µL de tampó RPE a la columna i es va centrifugar a 8000xg durant 15 segons. Es va realitzar un últim rentat amb EtOH 80% (Alcoholes Gual S.A.), es va centrifugar a 8000xg durant 2 minuts, es va descartar el sobrenedant i sense afegir més líquid a la columna es va centrifugar a 16000xg durant 2 minuts amb la tapa de la columna oberta per tal d'assecar la membrana. Es va transferir la columna en un eppendorf, es va afegir 14µL d'aigua estèril sense RNAses a la membrana per a poder eluir el RNA. Es va centrifugar a 16000xg durant 1 min. El RNA obtingut es va quantificar utilitzant el nanodrop (ND-1000 espectofotometre, ThermoFisher Scientific) i la seva integritat i qualitat amb el 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc, Sant Clara, CA, USA). El RNA va ser emmagatzemat a -80°C fins a la seva utilització.

### 4.17 RT-PCR en temps real

Per analitzar els canvis en l'expressió gènica provocats per la betametasona es van utilitzar sondes Taqman (thermo fisher). Primer es va realitzar la retrotranscripció de les mostres de RNA amb una transcriptasa inversa del virus de la leucèmia de ratolí de Moloney (MMLV) (Promega, Madison, WI, USA). Per a la reacció de retrotranscripció a 1000ng de RNA, es van afegir 1µL d'hexàmers aleatoris (Biotools) i aigua estèril fins un volum total de 13,75µL. La mostra es va incubar al termociclador a 70°C durant 5 minuts i un cop acabat el cicle es va deixar a 4°C durant 10 minuts. En fred, es va afegir, al mateix tub, 5µL de tampó de retrotranscripció del MMLV, 1,25µL de la barreja de nucleòtids, 4µL de H<sub>2</sub>O estèril, 0,5µL d'inhibidor de RNasa i 0,5µL de transcriptasa inversa del MMLV. Es va incubar al termociclador a 37°C durant 60 minuts. La copia de l'àcid desoxiribonucleic (cDNA) obtinguda es va emmagatzemar a -20°C fins a la seva utilització.

A causa de la menor quantitat de RNA obtingut en les mostres procedents d'illots pancreàtics es va pre-amplificar la mostra abans de poder analitzar-la per la RT-PCR. Per a amplificar es va utilitzar Taqman PreAmp Master Mix (ThermoFisher Scientific). Breument es van preparar una barreja de totes les sondes Taqman a analitzar (Taula 9) a una dilució 1/100 de cada sonda. Es va agafar 12,5µL de la barreja de sondes, 12,5µL de cDNA dels illots pancreàtics i 25µL de Taqman Preamp Master Mix 2x. Al termociclador es va utilitzar el següent protocol d'amplificació:

**Taula 7. Protocol de pre-amplificació dels illots pancreàtics de NOD tractats amb betametasona.**

Parà-metre	Activació enzim	Preamplificació PCR		Inactivació de l'enzim	Final
		14 cicles			
		Desnatura-lització	Anellament i elongació		
T <sup>o</sup>	95°C	95°C	60°C	99°C	4°C
Temps	10 min	15 sec	4 min	10 min	∞

Les mostres preamplificades es van emmagatzemar a -20°C.

La RT-PCR en temps real es va dur a terme en un termociclador LightCycler 480 (Roche). Es va preparar la barreja amb 0,75µL de sonda Taqman (ThermoFisher Scientific), 7,5µL de Master Mix de Taqman (Applied Biosystems) i 4,75µL H<sub>2</sub>O estèril o 3µL de H<sub>2</sub>O estèril en les mostres preamplificades. En fred es va dispensar 13µL o 11,25µL (mostres preamplificades) de la barreja, en cada pou d'una placa de 96 pous per a PCR (Sarstedt). Es va diluir 1:5 la cDNA de les mostres i 1:20 la cDNA de les mostres preamplificades, a la placa es va dispensar 2µL del cDNA 1:5 o 3,75µL del cDNA 1:20. Es va cobrir la placa amb plàstic (Sarstedt) i es va centrifugar a 250xg durant 1 minut. El protocol utilitzat a la LightCycler 480 va ser el següent:

**Taula 8. Protocol utilitzat per realitzar els experiments de RT-PCR en les diferents mostres de l'estudi.**

Parà-metre	UDG	Desnatura-lització	PCR		Fred
			50 cicles		
			Desnatura-lització	Elongació	
T <sup>o</sup>	50°C	95°C	95°C	60°C	40°C
Temps	2 min	10 min	15 sec	1 min	20 sec
Corba de calor	4.4	4.4	4.4	2.2	2.2
Adquisició	No	No	No	Si	No

Per a l'anàlisi de les dades es va seguir el mètode de  $2^{-\Delta Ct}$  normalitzant l'expressió dels gens problema en front el gen constitutiu (*Gapdh*) (Livak and Schmittgen, 2001). Per calcular el logaritme del canvi d'increment (FC) dels gens de les cèl·lules NIT-1 i dels illots es va normalitzar cada experiment contra la seva condició de MC corresponent, no es va calcular el logaritme del canvi d'increment de les mostres de pàncrees. La selecció dels gens candidats es va realitzar mitjançant tres estratègies:

- La selecció de gens alterats en microarrays de pacients amb DT1 (Planas et al., 2010).
- Comparació amb una base de dades d'interaccions de gens (Harmonizone) (Rouillard et al., 2016), per detectar gens regulats per la interacció amb el gen NR3C1 (Receptor de glucocorticoides).
- Una cerca bibliogràfica per avaluar la seva possible rellevància en diferents aspectes de la DT1.

Els gens identificats es van classificar en 3 grups diferents (autoantígens, autoimmunitat i metabolisme) depenen de la seva funció en la cèl·lula  $\beta$  o en la DT1 (Taula 9).

**Taula 9.** Llista de sondes taqman utilitzades en l'estudi.

Gen Ratolí	Referencia Catalog	Grup
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1	Constitutiu
<i>Ins2</i>	MM00731595_gH	Autoantigen/metabolisme
<i>Gad1</i>	Mm04207432_g1	Autoantigen
<i>Gad2</i>	Mm00484623_m1	Autoantigen
<i>Cd44</i>	Mm01277161_m1	Autoimmunitat
<i>Ccl2</i>	Mm00441242_m1	Autoimmunitat
<i>Cxcl2</i>	Mm00436450_m1	Autoimmunitat
<i>Cd14</i>	Mm00438094_m1	Autoimmunitat
<i>Il22ra1</i>	Mm01192943_m1	Autoimmunitat
<i>Pdl1</i>	Mm03048248_m1	Autoimmunitat
<i>Btnl2</i>	Mm01281666_m1	Autoimmunitat
<i>Btnl9</i>	Mm00555612_m1	Autoimmunitat
<i>Pcsk1</i>	Mm00479023_m1	Metabolisme
<i>Tcf7l2</i>	Mm00501505_m1	Metabolisme
<i>Ptprj</i>	Mm00501277_m1	Metabolisme
<i>Pten</i>	Mm00477208_m1	Metabolisme
<i>Igf1r</i>	Mm00802831_m1	Metabolisme
<i>Glis3</i>	Mm00615386_m1	Metabolisme
<i>Manf</i>	Mm00512511_m1	Metabolisme
<i>Ki67</i>	Mm01278617_m1	Metabolisme

## 4.18 Mostres Humanes

### 4.18.1 Assaig de toxicitat en PBMCs

Per a l'obtenció de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) humanes es va demanar la donació de 10mL de sang venosa a subjectes control. Tot els

participants van firmar el corresponent consentiment informat. Els criteris d'inclusió van ser tenir entre 18-40 anys i un índex de massa corporal entre 18,5 i 30 Kg/m<sup>2</sup>.

Per determinar els efectes directes de la betametasona en cèl·lules madures del sistema immunitari humà es van aïllar PBMCs utilitzant un gradient de densitat (Ficoll Paque, GE Healthcare, Marlborough, MA, USA). Un volum de 10mL de sang perifèrica es va diluir amb la mateixa quantitat de PBS; en tubs de 50mL es van dispensar 10mL de Ficoll Paque i suaument per la paret del tub, vigilant de no barrejar la sang amb el Ficoll Paque, 20mL de sang diluïda amb PBS. El tub es va centrifugar a 754xg durant 30 minuts i amb desacceleració 0. Es va recollir amb una pipeta Pasteur la interfase amb les PBMCs que es formà entre el Ficoll Paque i el sèrum i es va dipositar en un nou tub de 50mL. Es van centrifugar el tub a 400xg durant 5 minuts i es va descartar el sobrenedant. El botó cel·lular es va resuspendre en 15mL de PBS+2%SBF i es va centrifugar a 200xg 15 minuts per tal d'eliminar les plaquetes. El botó cel·lular es va diluir en 2mL de PBS+2%SBF i es va realitzar un comptatge i determinació de la viabilitat (protocol 4.6). Per estudis de viabilitat es van plaquejar 10<sup>6</sup>cel/mL en plaques de 96 pous amb concentracions de betametasona des de 0,1nM fins a 10<sup>6</sup>nM durant 48h. Acabades les 48h es va recuperar les PBMCs de cada pou en tubs de citometria, es va centrifugar 5 min a 400xg a TA per a eliminar el sobrenedant i es van resuspendre en el següent marcatge: AnnV FITC (ImmunoTools), 7-AAD (BD Bioscience), anti-CD3 APC (Biolegend, San Diego, CA, EUA), anti-CD14 APC-Cy7 (BioLegend) i anti-CD19 PE (ImmunoTools) (Taula 10), el marcatge es va incubar 20 min a TA en fosc. Les cèl·lules es van adquirir en un citometria de flux (FacsCanto II, BD Bioscience) i es van analitzar amb el programa Flowjo vX (BD Bioscience, Ashland, OR, EUA).

**Taula 10. Panell d'anticossos utilitzats per l'assaig de toxicitat en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica en humans.** APC: Alo ficocianina; APC-Cy7: Alo ficocianina-Cianina 7; PE: Ficoeritrina.

Antigen	Fluorocrom	Isotip	Clon	[Ús] (µg/mL)	Casa comercial
CD3-humà	APC	Mouse IgG1, κ	UCHT1	1,6	BioLegend
CD14-humà	APC-Cy7	Mouse IgG1, κ	63D3	1,6	BioLegend
CD19-humà	PE	Mouse IgG1, κ	HIB19	0,5	BioLegend

#### 4.18.2 Enquestes a mares sobre tractament prenatal amb betametasona i fills amb DT1

Per tal de determinar el possible efecte de la betametasona prenatal en el desenvolupament de la DT1 en humans es va realitzar un estudi retrospectiu en les famílies de nens amb DT1 del hospital Germans Trias i Pujol. Al tractar-se d'una malaltia amb un rang d'edat de diagnòstic tan elevat (des dels 1 anys fins l'edat adulta) dificulta la realització d'un seguiment prospectiu de nous naixements i a causa del baix nombre d'intervencions amb betametasona i baix nombre de nens amb DT1 es va decidir utilitzar la població de nens amb DT1 directament per l'estudi i els seus germans com a subjectes control.

Per a la realització de les enquestes es van reclutar tots els pacients pediàtrics amb DT1 diagnosticats entre els 1-20 anys d'edat (n=62). Com a grup control es van analitzar els germans dels pacients (n=62) amb DT1 diagnosticada.

Es va proporcionar un qüestionari a les mares amb fills amb DT1 (annex 1). L'estudi va ser aprovat pel comitè d'ètica i investigació clínica (CEIC) de l'hospital Germans Trias i Pujol i les mares van firmar el consentiment informat corresponent. El qüestionari va constar de 4 preguntes curtes per tal de conèixer el nombre de fills, quins d'aquest fills tenen DT1, durada de la gestació, el pes del nadó en néixer i sobretot si la mare va ser sotmesa a un tractament amb glucocorticoides prenatals (betametasona). El qüestionari va ser realitzat al Servei de Pediatria de l'hospital Germans Trias i Pujol.

L'estudi van ser realitzat en concordança amb la declaració d'Helsinki i es va dur a terme després de l'aprovació del CEIC de l'hospital Germans Trias i Pujol. Tots els participants van signar el consentiment informat abans d'entrar a l'estudi.

#### 4.19 Anàlisi estadística

L'anàlisi estadístic es va realitzar amb el programa Graphpad Prism 7.0 (GraphPad software Inc, San Diego, CA, EUA). Es va utilitzar el test de Dunn (test de Friedman) i el test de Tukey (ANOVA de dos factors) per a la comparació entre múltiples grups i per a la comparació entre 2 grups es va utilitzar el test de Mann Whitney per a dades no aparellades i el test de Wilcoxon per a dades aparellades. Per a l'estudi d'incidència de la DT1 *in vivo* es va utilitzar el test de supervivència de Log-Rank de Mantel-Cox. Per l'anàlisi de les dades obtingudes en les enquestes a pacients amb DT1 es va utilitzar un test binomial per a comparar els resultats del grup control amb els resultat del grup amb DT1 en el percentatge de tractaments prenatals amb betametasona. Es va establir un nivell de significació del p valor menor de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

---

---

# *Resultats*

---

---





# 5. Resultats

## 5.1 Efectes de la betametasona en el model experimental

### 5.1.1 La betametasona prenatal redueix la incidència de DT1

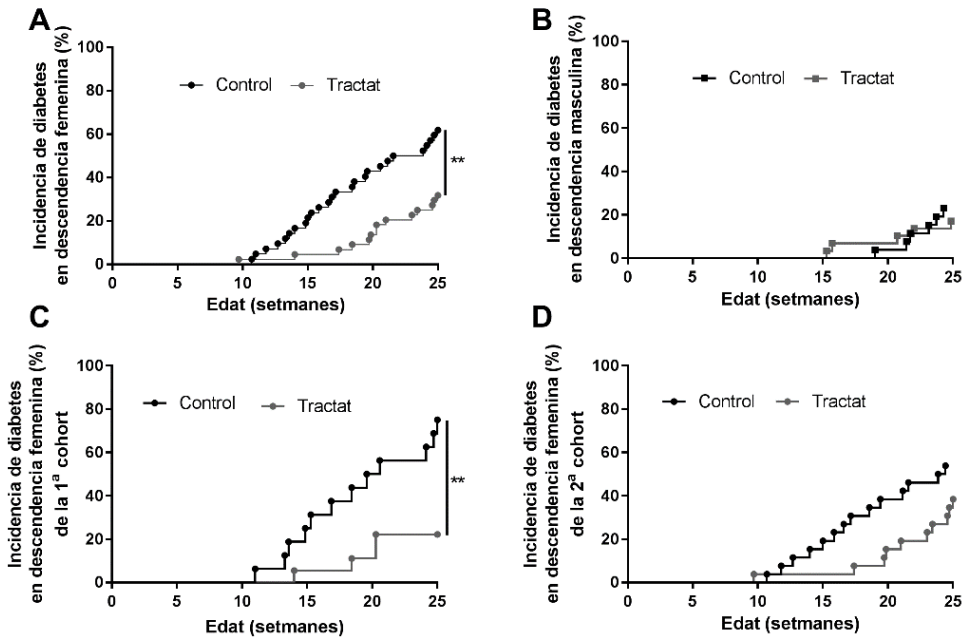
El principal objectiu d'aquesta tesi és determinar l'efecte prenatal de la betametasona sobre la DT1 en ratolins NOD. Amb aquesta finalitat, es van administrar 0,1mg de betametasona en PBS+EtOH a les mares gestants el dia 18.5E i PBS+EtOH sense betametasona com a control. Les cries dels 2 grups van utilitzar-se per realitzar el seguiment metabòlic des de les 10 setmanes fins a les 25 setmanes d'edat.

En femelles es va observar una reducció estadísticament significativa de la incidència de DT1 a les 25 setmanes d'edat en el grup tractat respecte al grup control. El grup tractat va finalitzar l'estudi amb un 32% d'incidència, mentre que el grup control va presentar un 62% d'incidència (Figura 6A). A més, es va observar un endarreriment del desenvolupament de DT1 en 9 dels 13 ratolins diabètics en el grup tractat amb betametasona prenatal, ja que van ser diagnosticades entre les 20 i les 25 setmanes, mentre que el grup control manté un increment constant de la incidència des de les 12 setmanes fins a les 25 setmanes (Figura 6A).

En mascles descendents de mares tractades prenatalment amb betametasona no s'aprecia una reducció estadísticament significativa de la incidència de DT1: s'observa un 17% d'incidència en els del grup tractat i un 23% d'incidència en els del grup control. En canvi, hi ha una acceleració en l'edat de diagnòstic de la DT1 en el grup tractat amb betametasona, començant a presentar-se la malaltia a les 15-16 setmanes, mentre que el grup control la inicia a les 19-20 setmanes (Figura 6B).

La incidència en femelles descendents de mares tractades prenatalment amb betametasona es va determinar utilitzant 2 cohorts per separat en diferents mesos. La incidència de DT1 en la primera cohort de femelles va ser de 75% en el grup control (n=16), mostrant diferències significatives amb el grup tractat amb betametasona prenatal amb una incidència del 22% (n=18) (Figura 6C). En la segona cohort la incidència va ser del 54% (n=24) en les femelles del grup control, mentre que la incidència en les femelles del grup tractat amb betametasona va ser del 38%

(n=26) (Figura 6D). Tot i ser menor la diferència entre grups, les cries de les mares tractades amb betametasona presenten una menor incidència de DT1 que no pas el grup control. En les dues cohorts s'observa un retard en l'edat d'inici clínic de la malaltia, passant de les 11-12 setmanes del grup control a unes 18-20 setmanes en el grup tractat amb betametasona, exceptuant una femella de la segona cohort que va debutar a les 9 setmanes d'edat (Figura 6D).



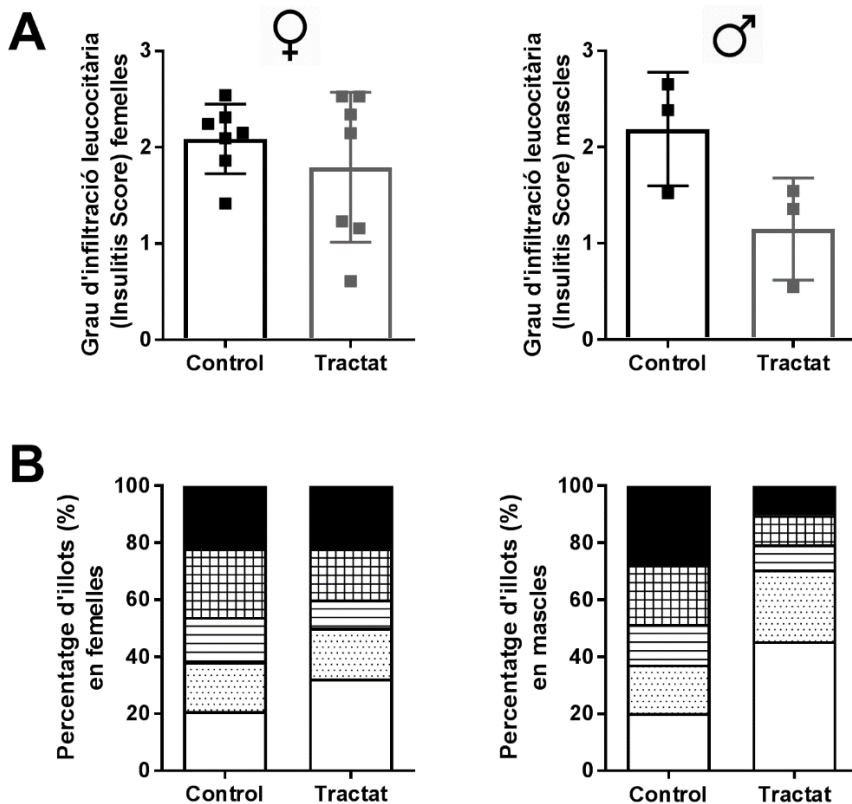
**Figura 6. La betametasona prenatal redueix la incidència de diabetis tipus 1 (DT1) en les femelles filles de mares tractades A)** incidència acumulada de DT1 en ratolins NOD femella filles de mares tractades amb betametasona (cercle gris, n=44) i filles de mares no tractades (cercle negre, n=42) **B)** incidència acumulada de DT1 en ratolins NOD mascles fills de mares tractades amb betametasona (cercle gris, n=29) i filles de mares no tractades (cercle negre, n=26) **C)** incidència acumulada de DT1 en ratolins NOD femella filles de mares tractades amb betametasona (cercle gris, n=18) i filles de mares no tractades (cercle negre, n=18) en el primer experiment. **D)** incidència acumulada de DT1 en ratolins NOD femella filles de mares tractades amb betametasona (cercle gris, n=26) i filles de mares no tractades (cercle negre, n=24) en el segon experiment (\*\*p<0,01, test de supervivència de Log-Rank de Mantel-Cox).

### 5.1.2 La betametasona afecta la infiltració leucocitària als illots pancreàtics.

Per tal d'avaluar el nivell d'infiltració leucocitària als illots pancreàtics, es van analitzar crioseccions de pàncrees tenyides amb H/E procedents de ratolins no diabètics de 25 setmanes de l'estudi d'incidència.

S'observa que el grau d'infiltració leucocitària (insulitis score) de les femelles del grup tractat (insulitis score de 1,7) tendeix a ser inferior que l'observat en femelles

del grup control (insulitis score de 1,9). En mascles, el grup tractat presenta una insulitis score (1,35) que tendeix a ser inferior que l'observada en mascles del grup control (insulitis score de 2,4), la reducció és molt més evident que en les femelles (Figura 7A). A més, la infiltració que sofreixen els mascles del grup tractat (70% illots sense insulitis o amb periinsulitis) tendeix a ser més benigne que la soferta pel grup control (37% d'illots sense insulitis o amb periinsulitis). En les femelles la infiltració del grup tractat tendeix a ser major que la dels mascles (50% illots sense insulitis o amb periinsulitis), però segueix sent més benigne que les femelles del grup control (37% illots sense insulitis o amb periinsulitis) (Figura 7B).



**Figura 7. El tractament amb betametasona prenatal tendeix a reduir la infiltració leucocitària al pàncrees.** **A)** Insulitis score de ratolins NOD no diabètics al final del seguiment metabòlic (25 setmanes), ratolins fills de mares no tractades (barra negra, n=3-7) i fills de mares tractades amb betametasona (barra gris, n=3-7). Els resultats estan expressats com a mitjana + desviació estàndard (no significatiu (NS), test de Mann Whitney). La gràfica esquerra correspon a les femelles i la gràfica dreta correspon als mascles. **B)** Percentatge d'illots en cada categoria d'infiltració: blanc = 0, no infiltració; puntejat = 1, periinsulitis; rayat = 2, insulitis lleu (<25% d'infiltració); a quadres = 3, insulitis moderada (25-75% d'infiltració); negre = 4, insulitis severa (>75% d'infiltració). La gràfica esquerra correspon a les femelles i la gràfica dreta correspon als mascles. Gràfica dreta: Percentatge d'illots en cada categoria d'infiltració de les femelles del segon experiment.

Tot i no apreciar una reducció significativa en la incidència de DT1 en mascles *in vivo*, sí que s'observa un efecte biològic a nivell d'infiltrat leucocitari en el pàncrees. En canvi, en femelles sí que apreciem una reducció significativa de la incidència de DT1 *in vivo* amb una menor tendència en el nivells d'infiltrat leucocitari entre el grup tractat i el grup control.

En resum, s'observa una clara tendència amb probable efecte biològic a reduir el nombre de cèl·lules del sistema immunitari presents en els illots dels ratolins tractats prenatalment amb betametasona.

### 5.1.3 La betametasona prenatal altera les subpoblacions leucocitàries a timus i melsa

Per determinar l'efecte directe sobre el sistema immunitari dels ratolins nous, les mares gestants es van tractar amb 0,1mg de betametasona el dia 20.5E i amb PBS com a control. Les cries van ser sacrificades a dia 1 post part (d1) i a dia 4 post part (d4) per poder analitzar les diferents subpoblacions leucocitàries a timus i melsa.

#### 5.1.3.1 Timus

Els timus dels animals tractats amb betametasona prenatal van presentar un menor pes comparat amb els animals no tractats ( $\Delta_{\text{increment}} = -62,05\%$ ) a d1. A d4 no es van observar diferències entre els 2 grups ( $\Delta_{\text{increment}} = 0,76\%$ ). Això reflecteix la recuperació del timus a d4. De forma similar, a d1 es va trobar una reducció estadísticament significativa en el nombre de cèl·lules al timus en el grup tractat en comparació amb el grup no tractat. A d4, no es van apreciar diferències entre els 2 grups (Figura 8A).

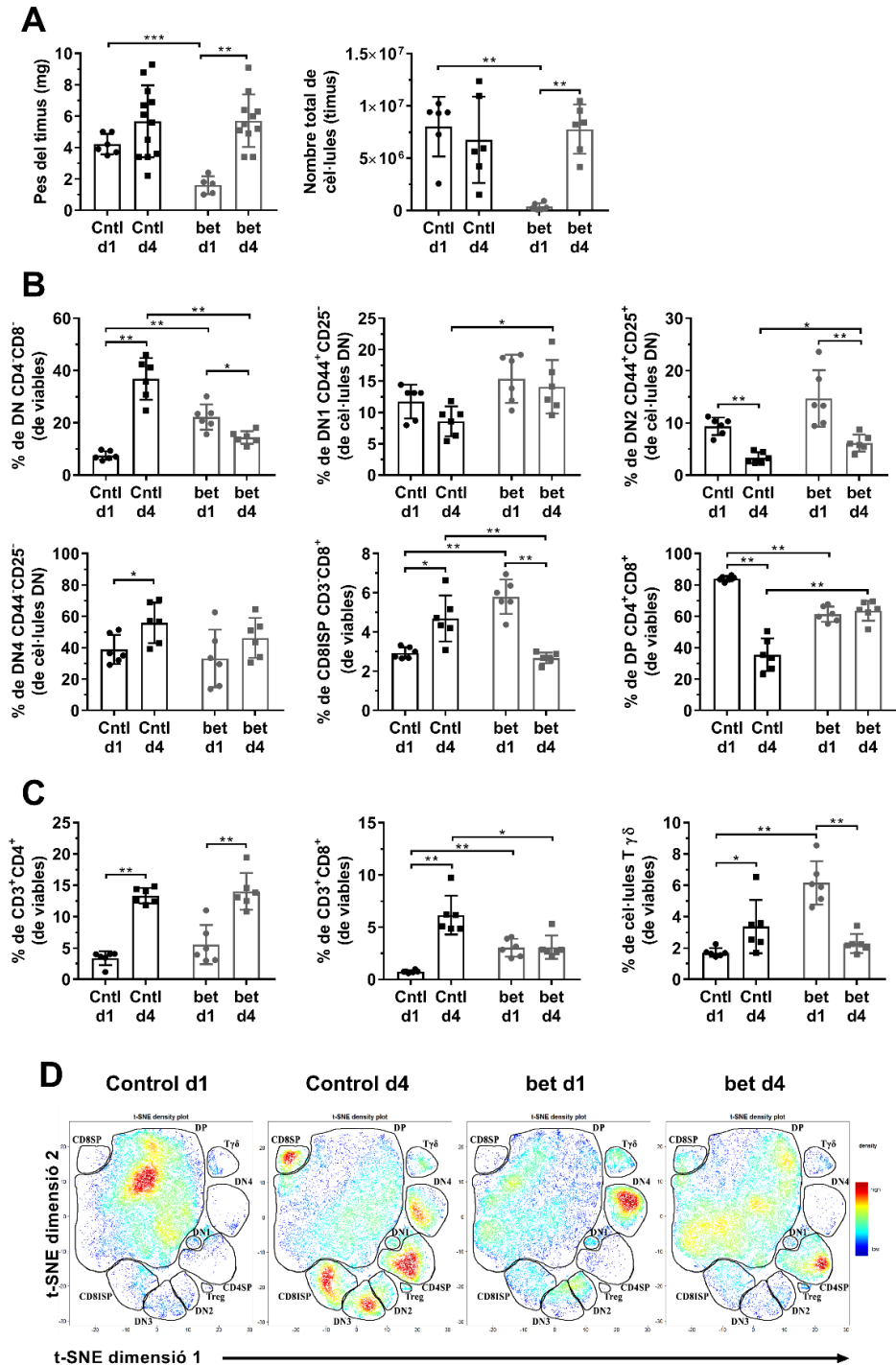
L'efecte de la betametasona en la composició cel·lular del timus a d1 i d4 va ser analitzada. Respecte a la maduració dels timòcits, els percentatges de les diferents subpoblacions es van trobar alterades per l'administració de la betametasona prenatal (Figura 8B). El primer estadi dels precursors limfocitaris al timus és l'estadi de doble negatiu (DN) i a d1 s'observa un augment en el percentatge de DN en el grup tractat respecte al grup control. En canvi, a d4 es va observar major percentatge de DN en el grup control respecte al grup tractat. Aquestes diferències fan que mentre el grup control augmenti el percentatge de DN entre d1 i d4, el grup tractat es comporta totalment a la inversa, ja que s'observa una reducció en el percentatge d'aquestes cèl·lules. Abans d'arribar a l'estadi de doble positiu (DP) es diferencien 5 estadis intermedis depenent de l'expressió de CD8, CD25 i CD44. El primer estadi és el DN1 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), on es va observar un increment en el percentatge del grup tractat a d4 quan es compara amb els controls. El segon estadi és el DN2 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), on només es va observar un increment del percentatge del

grup tractat a d4 respecte als controls i entre d1 i d4 es va observar una forta reducció significativa en els percentatges dels dos grups. El tercer estadi és el DN3 (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>) i en aquest cas no es va observar cap diferència entre d1 i d4, ni entre tractats i controls. El quart estadi és el DN4 (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>), on no es van trobar diferències significatives entre controls i tractats, però sí que hi ha un augment estadísticament significatiu en el grup control quan es comparen els d1 i d4. Aquest augment també es va observar en el grup tractat encara que no sigui estadísticament significatiu. En l'últim estadi abans de tornar-se timòcits DP, caracteritzat per l'expressió de CD8 i l'absència de CD3 en la membrana. Aquest timòcits s'anomenen limfòcits T immadurs CD8 positius (CD8ISP); es va observar un increment en el percentatge de CD8ISP a d1 en el grup tractat en comparació del grup control i a d4 es va observar un menor percentatge en el grup tractat que en el grup control. A més, en el grup tractat es va observar una disminució del percentatge del d1 al d4. En canvi, en el grup control, es va observar un increment en el percentatge de CD8ISP entre el d1 i el d4. Els timòcits doble positius (DP) es van trobar els percentatges significativament reduïts a d1 després del tractament amb betametasona perquè aquesta població és una de les més sensibles als glucocorticoides (Figura 8B). A d4, en canvi, en el grup tractat no es va observar la mateixa disminució en el percentatge observat en el grup control.

Un cop les cèl·lules han superat la fase de DP i la selecció positiva al timus expressaran CD4 o CD8 i ja es podran considerar limfòcits T madurs. En analitzar aquestes subpoblacions tímiques no es va trobar cap diferència en els limfòcits T CD4 entre tractats i controls, però en ambdós casos va haver-hi un augment del percentatge de limfòcits T CD4 a d4 comparat amb el d1. D'altra banda, es va observar un augment en el percentatge de limfòcits T CD8 a d1 en els ratolins tractats amb betametasona respecte als controls, i de forma inversa a d4, on tenim una disminució del percentatge de limfòcits T CD8 en els ratolins tractats respecte als controls. Similar als limfòcits T CD4, el percentatge de limfòcits T CD8 en els controls augmenta de d1 a d4 i en canvi en el grup tractat el percentatge és similar entre el d1 i el d4. En el cas dels limfòcits T  $\gamma\delta$ , es va observar un clar augment a d1 en el grup tractat respecte al grup control, tot i que a d4 les diferències entre els 2 grups es redueixen i tendeixen a igualar-se. Això és degut a l'augment de limfòcits T  $\gamma\delta$  en el grup control i a la reducció en el grup tractat entre d1 i d4 (Figura 8C). Per tal de poder determinar la composició del timus a d1 i a d4 es va realitzar una anàlisi t-SNE utilitzant les dades obtingudes per citometria de flux (Figura 8D). Utilitzant aquest tipus de gràfic s'aprecien perfectament les diferències entre les subpoblacions dels ratolins tractats i controls. A d1 s'observa una clara dominància dels timòcits DP en els controls, mentre que en els tractats no s'observa aquesta subpoblació, sinó que s'observa un enriquiment en els timòcits DN4. A d4 es veu la clara evolució del timus dels controls cap a l'increment de limfòcits T CD4 i CD8,

## Efecte de la betametasona prenatal en la DT1

mentre que en els ratolins tractats només es visualitza un lleu augment en els limfòcits T CD4, però no amb la mateixa densitat que en els controls.



**Figura 8. El tractament prenatal amb betametasona pertorba la maduració dels timòcits al timus. A)** Pes i nombre total de cèl·lules al timus. Els símbols negres representen el grup control (Cntl) i els símbols grisos representen el grup tractat amb betametasona (bet), els punts representen el dia 1 postpart (d1) i els quadrats representen el dia 4 postpart (d4). Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  desviació estàndard (d.e.) de  $n \geq 5$  ratolins (\*\* $p < 0,01$  i \*\*\* $p < 0,001$ , Test de Mann-Whitney). **B)** Percentatge de timòcits en maduració durant la fase doble negativa (DN, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), fase 1 de DN (DN1, CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), fase 2 de DN (DN2, CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), fase 4 de DN (DN4, CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>), immadures CD8 positives (CD8ISP, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) i fase de doble positives (DP, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). Els símbols negres representen el grup control (Cntl) i els símbols grisos representen el grup amb betametasona (bet), els punts representen el dia 1 postpart (d1) i els quadrats representen el dia 4 postpart (d4). Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  d.e. de  $n \geq 5$  ratolins (\* $p \leq 0,05$  i \*\* $p < 0,01$ , Test de Mann-Whitney). **C)** Percentatge de timòcits CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> i  $\gamma\delta^+$  dins les cèl·lules viables. Els símbols negres representen el grup control (Cntl) i els símbols grisos representen el grup amb betametasona (bet), els punts representen el dia 1 postpart (d1) i els quadrats representen el dia 4 postpart (d4). Els resultats estan expressats com a mitjana  $\pm$  d.e. de  $n \geq 5$  ratolins (\*\* $p < 0,01$  i \*\*\* $p < 0,001$ , test de Mann-Whitney). **D)** Representació t-SNE de densitat cel·lular per a cada població tímica analitzada per citometria de flux en els grups Cntl i bet a d1 i d4. Les gràfiques mostren els resultats de 2 animals representatius per grup.

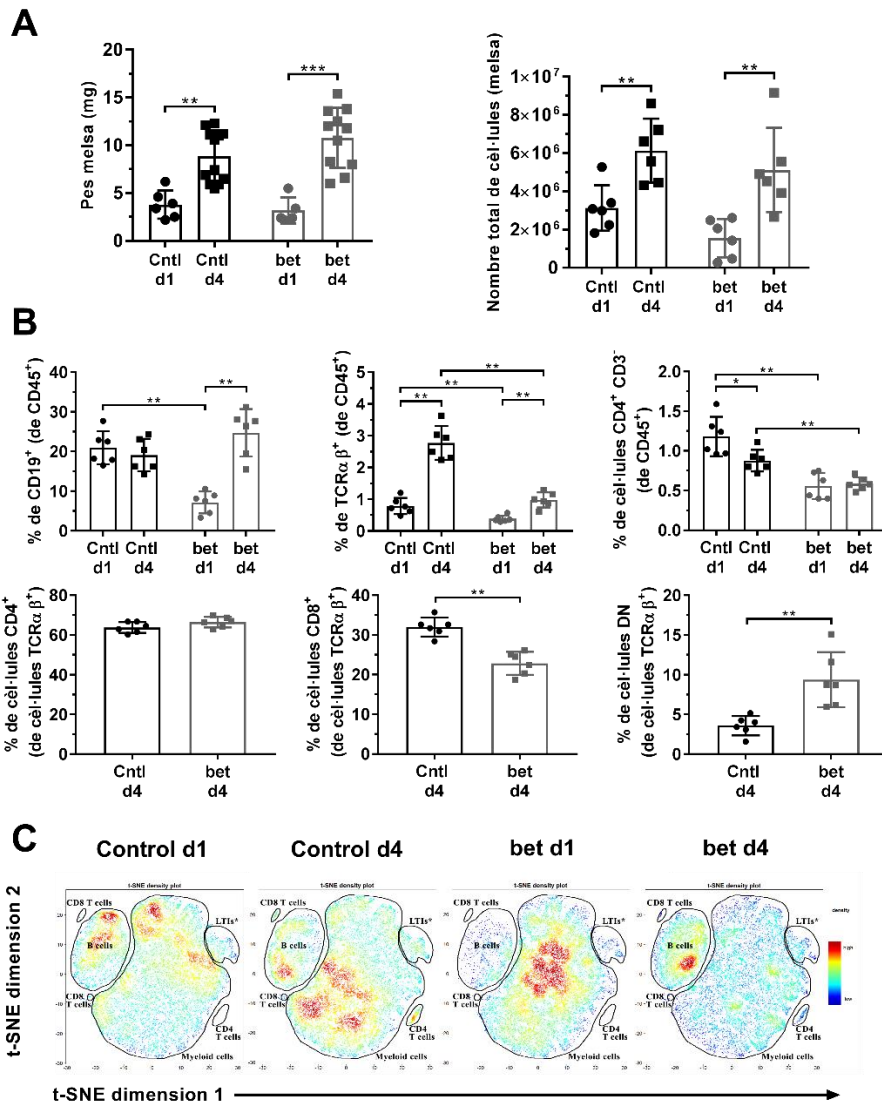
### 5.1.3.2 Melsa

Abans de la disgregació mecànica per obtenir les cèl·lules es va determinar el pes de la melsa dels ratolins. No es van observar diferències significatives entre els 2 grups. Tot i això, el pes a d1 va tendir a ser menor en el grup tractat ( $\Delta_{\text{increment}} = -16,32\%$ ), mentre que a d4 el pes de la melsa va tendir a ser major en el grup tractat ( $\Delta_{\text{increment}} = 21,5\%$ ). De forma similar, en el nombre de cèl·lules s'observa una tendència a disminuir el nombre total en el grup tractat a d1 respecte al grup control. Tot i no ser estadísticament significatiu, es van trobar  $10^6$  cèl·lules més en controls que no en tractats de mitjana. A d4 aquestes diferències es redueixen i el nombre cel·lular és similar en els 2 grups (Figura 9A).

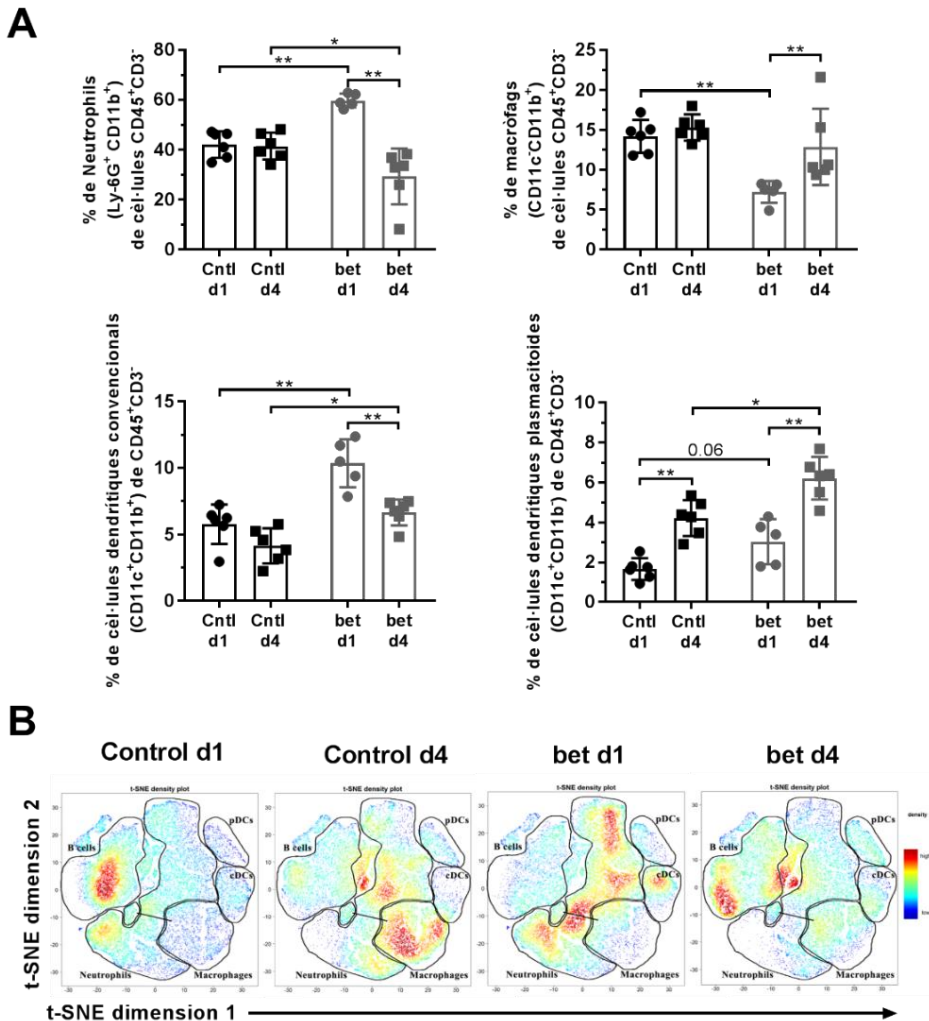
Quan es van analitzar les diferents subpoblacions del sistema immune que conformen la melsa, es van trobar alteracions causades per la betametasona en el compartiment dels limfòcits B. A d1 trobem una reducció significativa en el percentatge d'aquests limfòcits en el grup tractat respecte al grup control, en aquest cas l'efecte es reverteix a d4, ja que els percentatges entre els 2 grups són similars. Però no només els limfòcits B es van veure afectats, com s'ha descrit anteriorment al timus, els limfòcits T també van presentar canvis deguts a la betametasona, encara que en aquest cas sigui de forma indirecta i a causa dels efectes observats al timus. En melsa es va trobar un menor nombre de limfòcits T  $\alpha\beta$  en el grup tractat respecte al grup control, tant a d1 com a d4. D'igual manera que en el timus, el percentatge de limfòcits T CD4 va ser igual entre els 2 grups i en canvi es va observar una reducció en el percentatge de limfòcits T CD8 en el grup tractat respecte al control. De forma similar al timus, aquesta reducció en els limfòcits T CD8 a la melsa va ser provocada per un augment en el percentatge de limfòcits DN. Altres subpoblacions alterades a la melsa són les LTIs, aquestes cèl·lules tenen la



peculiaritat de ser CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> i de poder iniciar la formació d'òrgans limfoides terciaris directament al teixit diana de la resposta immunitària. Es va observar una reducció del percentatge de les cèl·lules LTIs en el grup tractat amb betametasona tant a d1 com a d4 respecte al grup control (Figura 9B). Per tal de poder determinar la composició cel·lular de la melsa a d1 i a d4 es va realitzar una anàlisi t-SNE utilitzant les dades obtingudes per citometria de flux. Utilitzant aquests gràfics es va poder observar clarament les diferències en la composició de la melsa entre el grup tractat i el grup control. Per exemple, es pot observar clarament com evolucionen els limfòcits B en els dos grups en els dos dies analitzats o com la presència de limfòcits T és mínima a d1 en les 2 condicions (Figura 9C). Juntament amb l'anàlisi de les poblacions limfocitàries es va determinar com evolucionaven altres cèl·lules del sistema immunitari del ratolí després del tractament prenatal amb betametasona. Es va observar un important increment en el percentatge de neutròfils en el grup tractat a d1 respecte al control, increment que es veu revertit a d4, on el grup tractat presenta menor percentatge de neutròfils que el grup control (Figura 10A). No només neutròfils es veuen afectats per la betametasona, els macròfags i les DCs també mostren canvis en els percentatges. En els macròfags es va observar una disminució estadísticament significativa a d1 en el percentatge del grup tractat i aquests valors augmenten a d4 de forma significativa reduint la diferència amb el grup control. Les DCs convencionals es van veure augmentades significativament en el grup tractat, tant a d1 com a d4, respecte al grup control. A més a d4 es va observa una forta reducció en el percentatge d'aquestes cèl·lules en el grup tractat amb betametasona en comparació amb el d1, seguint la mateixa tendència que el grup control. Les DCs plasmacitoides es van trobar significativament augmentades a d4 en el grup tractat respecte al control. La tendència entre d1 i d4 va ser similar en ambdós grups, ja que es va observar un augment en el percentatge d'aquestes cèl·lules (Figura 10A). De forma similar, es va realitzar una anàlisi t-SNE utilitzant les dades obtingudes per citometria de flux en la melsa a d1 i d4 per visualitzar les poblacions mieloides. Utilitzant aquestes gràfiques es va poder observar clarament les diferències en la composició de la melsa entre el grup tractat i el grup control i s'observa clarament l'augment en la densitat de neutròfils a d1 en el grup tractat i com a d4 es redueixen per sota els nivells del grup control o les diferències en la població de macròfags a dia 4 (Figura 10B).



**Figura 9.** Les subpoblacions limfoides es veuen alterades a la melisa degut a la betametasona prenatal. **A)** Pes i nombre total de cèl·lules a la melisa. Els símbols negres representen el grup control (Cntl) i els símbols grisos representen el grup tractat amb betametasona (bet), els punts representen el dia 1 postpart (d1) i els quadrats representen el dia 4 postpart (d4). Els resultats estan expressats com a mitjana ± desviació estàndard (d.e.) de n≥5 ratolins (\*\*p<0,01 i \*\*\*p<0,001, Test de Mann-Whitney). **B)** Percentatge de limfòcits (cèl·lules B CD19<sup>+</sup> i cèl·lules T TCRαβ<sup>+</sup>) i cèl·lules CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> dins de les cèl·lules viables. Percentatge de cèl·lules CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> i DN de la població de limfòcits T únicament del d4. Els símbols negres representen el grup control (Cntl) i els símbols grisos representen el grup amb betametasona (bet), els punts representen el dia 1 postpart (d1) i els quadrats representen el dia 4 postpart (d4). Els resultats estan expressats com a mitjana ± d.e. de n≥5 ratolins (\*p≤0,05 i \*\*p<0,01, Test de Mann-Whitney). **C)** Representació t-SNE de densitat cel·lular per a cada població a la melisa analitzada per citometria de flux en els grups Cntl i bet a d1 i d4. L'asterisc (\*) fa referència a una població que podrien ser cèl·lules iniciadores de teixit limfoide (LTIs, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), però cap marcador específic d'aquesta subpoblació va ser utilitzat en el panell de citometria (taula 3). Les gràfiques mostren resultats de 2 animals representatius per grup.



**Figura 10.** Alteracions a les subpoblacions d'esplenòcits tipus mioide en ratolins tractats amb betametasona prenatal. **A)** Percentatge de neutròfils (Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>), macròfags (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>), cèl·lules dendrítiques convencionals (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) i cèl·lules dendrítiques plasmacitoides (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>) dins de la població CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> en la melsa. Els símbols negres representen el grup control (Cntl) i els símbols grisos representen el grup amb betametasona (bet), els punts representen el dia 1 postpart (d1) i els quadrats representen el dia 4 postpart (d4). Els resultats estan expressats com a mitjana ± desviació estàndard de n≥5 ratolins (\*\*p<0,01 i \*\*\*p<0,001, Test de Mann-Whitney). **B)** Representació t-SNE de densitat cel·lular per a cada població mioide a la melsa analitzada per citometria de flux en els grups Cntl i bet a d1 i d4. Les gràfiques mostren resultats de 2 animals representatius per grup.

En resum, l'administració prenatal de betametasona provoca hipotròfia del timus, canvis en les freqüències relatives de leucòcits innats de la melsa i una colonització tardana dels limfòcits T i B. Molts d'aquests canvis són reversibles en el temps, com la hipotròfia del timus.

### 5.1.4 La betametasona prenatal altera el repertori de TCR dels limfòcits T

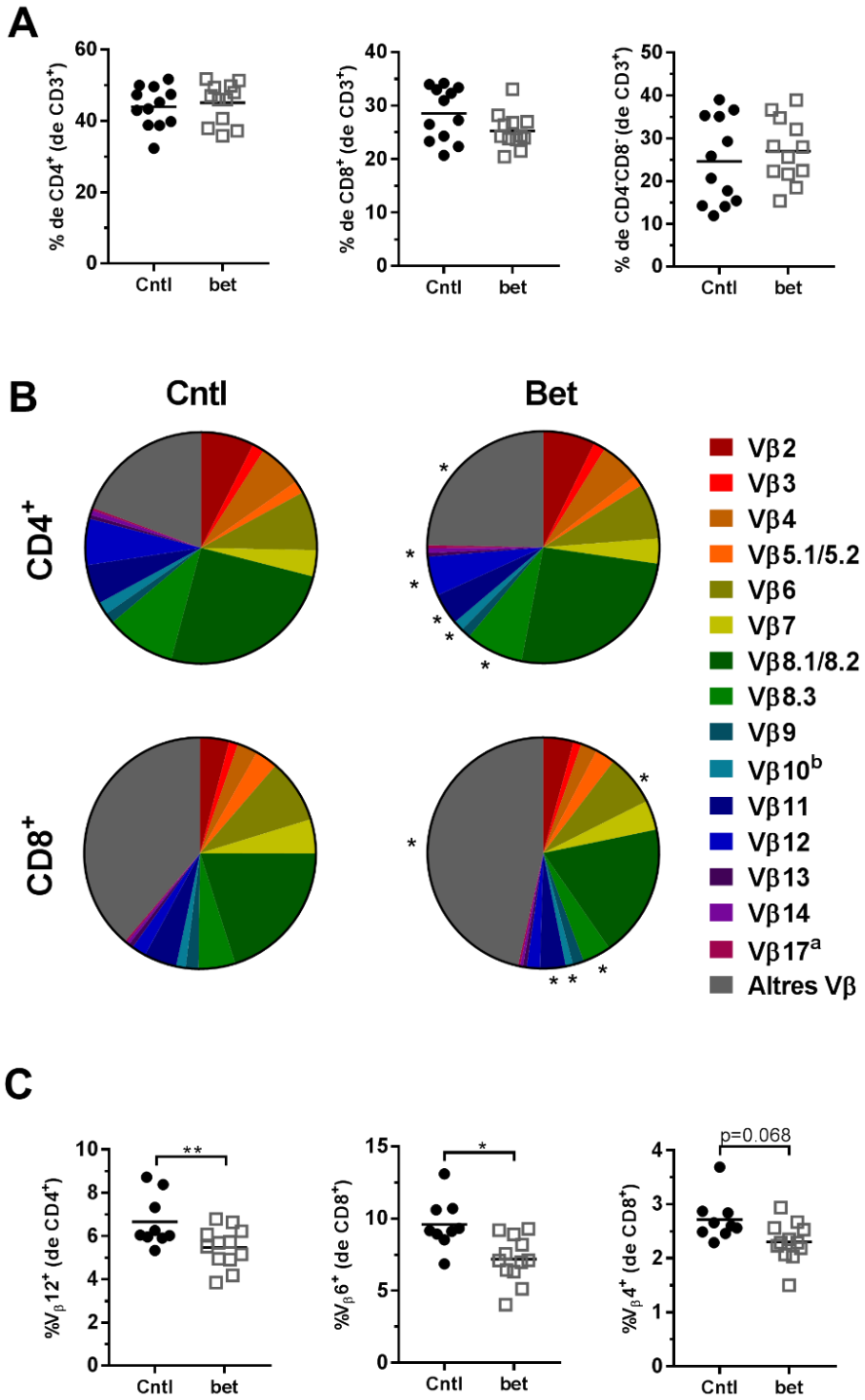
Per tal de determinar fins a quin punt la betametasona podria modificar de forma permanent el sistema immunitari a l'edat adulta es van seleccionar ratolins NOD de 6 setmanes d'edat tractats i no tractats prenatalment amb betametasona per analitzar el repertori T, segons les famílies de V $\beta$  del TCR.

Primerament es va analitzar l'estat de les diferents subpoblacions de limfòcits T en la melsa i tot i no observar cap canvi estadísticament significatiu si que s'observa una tendència en la població de limfòcits T CD8: Es va detectar una tendència en reducció del percentatge en el grup tractat respecte al control. De forma similar es va observar una tendència a l'augment tot i no ser estadísticament significatiu en el percentatge de limfòcits DN en el grup tractat respecte al control (Figura 11A).

D'aquestes subpoblacions es van analitzar els tipus de TCR tant dels limfòcits CD4 com del CD8. En els limfòcits CD4 del grup tractat es va observar una reducció estadísticament significativa en les famílies V $\beta$ 8.3, 10<sup>b</sup>, 11, 12 i 14 en el grup tractat amb betametasona prenatal respecte al grup control. Aquesta reducció en moltes famílies V $\beta$  va provocar l'augment del percentatge de les famílies V $\beta$  no detectables (Figura 11B). En els limfòcits CD8 es va observar un efecte similar i es van trobar significativament reduïts els percentatges de les famílies V $\beta$ 6, 8.3, 10<sup>b</sup> i 11 en el grup tractat amb betametasona prenatal respecte al grup control. Igual que en els limfòcits T CD4, això va provocar l'augment del percentatge de les famílies V $\beta$  no detectables (Figura 11B).

D'aquests TCR cal destacar els resultats de la família V $\beta$ 12 dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> i la família V $\beta$ 4 i V $\beta$ 6 dels limfòcits T CD8<sup>+</sup>, on es va observar una disminució estadísticament significativa d'aquests TCR que estan implicats en l'infiltrat pancreàtic i susceptibilitat a la malaltia en el ratolí NOD (Figura 11C).

Aquests resultats indiquen que la betametasona provoca canvis de llarga durada en el repertori del TCR dels limfòcits T. A més, aquests resultats suggereixen que la disminució en la Insulitis score anteriorment observada pot ser a causa del menor percentatge dels TCR típics de l'infiltrat leucocitari en els illots pancreàtics del model NOD.



**Figura 11. La betametasona indueix canvis en les famílies de receptors de cèl·lula T (TCR) fins a 6 setmanes després del tractament. A)** Percentatge de limfòcits T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> dins de la població de limfòcits CD3<sup>+</sup> del grup control (Cntl, punts negres) i del grup tractat amb betametasona (bet, quadrats grisos). La línia representa la mitjana de 12 ratolins independents (no significatiu, test de Mann-Whitney). **B)** Comparació de la utilització de les cadenes V $\beta$  del TCR de les cèl·lules CD4<sup>+</sup> i de les cèl·lules CD8<sup>+</sup> en ratolins femelles de 6 setmanes de edat que van rebre betametasona (bet) o PBS (Cntl) prenatalment. Cada cadena V $\beta$  esta representada per una porció proporcional a la freqüència de cada cadena V $\beta$  respecte al total (de mitja la cobertura va ser d'entre el 55 i el 80% de tots les possibles cadenes V $\beta$  dels limfòcits T, "altres V $\beta$ " indica totes les cadenes V $\beta$  no identificades pel panell d'anticossos utilitzat). Les porcions marcades amb un asterisc són significativament diferents entre les 2 condicions (Cntl contra bet). **C)** Resultats detallats de les cadenes rellevants del TCR V $\beta$ 12 en les CD4<sup>+</sup> i V $\beta$ 4 i V $\beta$ 6 en les CD8<sup>+</sup> del grup control (Cntl, punts negres) i del grup tractat amb betametasona (bet, quadrats grisos). La línia representa la mitjana de 9-12 ratolins independents (\*p<0,05 i \*\*p<0,01, N-way ANOVA).

## 5.2 Efectes de la betametasona en cultius cel·lulars

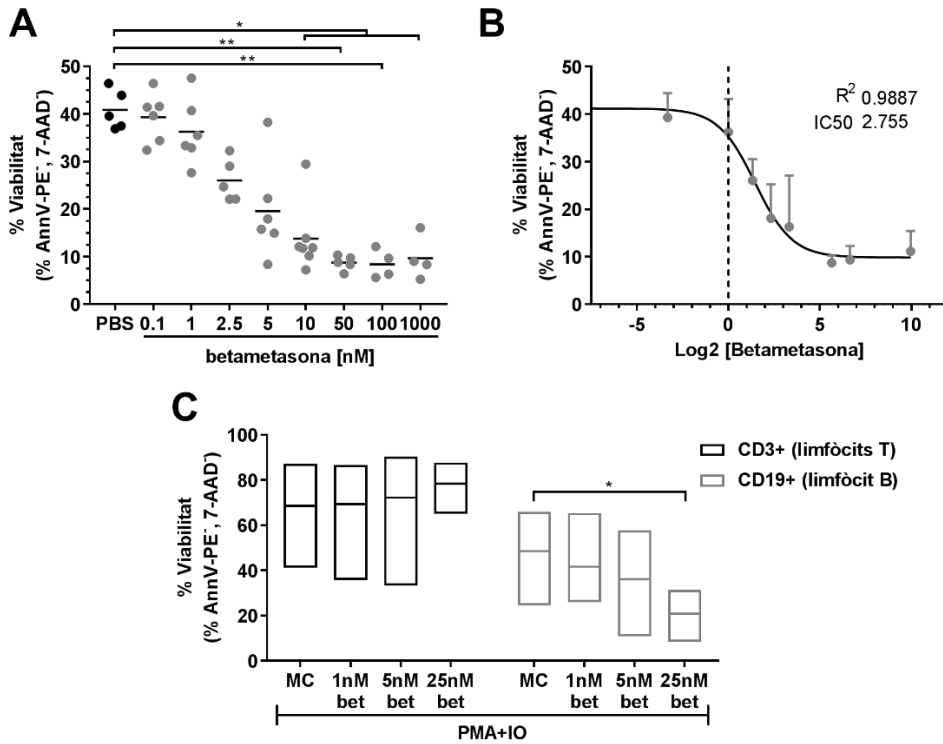
### 5.2.1 La betametasona redueix la viabilitat dels esplenòcits

Un cop determinats els efectes de la betametasona en el model murí NOD i la seva capacitat de modificar els diferents compartiments leucocitaris del nouat, es va avaluar la toxicitat de la betametasona *in vitro* en cèl·lules del sistema immunitari de l'adult. Esplenòcits de ratolí NOD es van cultivar en presència de betametasona durant 24 hores per després analitzar la seva viabilitat.

Es va observar un clar efecte dosi-resposta en la viabilitat cel·lular arribant a la màxima pèrdua de viabilitat a la concentració de 50nM. Trobem una pèrdua estadísticament significativa de la viabilitat a partir de la dosi de 10nM de betametasona fins a la dosi de 1000nM respecte al control de PBS (Figura 12A). Per tal de calcular la concentració inhibidora 50 (IC50) es va realitzar una regressió no lineal sigmoïdal de l'assaig de toxicitat. L'ajustament de la corba va ser superior a 0,95 ( $R^2=0,9887$ ) i la IC50 obtinguda va ser de 2,755nM de betametasona (Figura 12B).

Per tal de comprovar la reversibilitat d'aquest efecte, es van cultivar esplenòcits de ratolí NOD amb un estímul de proliferació com la PMA+IO i diferents concentracions de betametasona. La viabilitat d'aquests cultius va ser determinada a les 72h. Sorprenentment, no es va observar cap efecte de la betametasona en la viabilitat dels limfòcits T (CD3+) a cap de les concentracions estudiades. En canvi, sí que es va observar una reducció estadísticament significativa en la viabilitat dels limfòcits B (CD19+) a 25nM de betametasona (Figura 12C).

En resum, els limfòcits es veuen altament afectats per la betametasona induint la seva mort cel·lular. Els limfòcits, especialment els T, sota un estímul d'estimulació veuen reduït l'efecte nociu de la betametasona.



**Figura 12.** La betametasona afecta la viabilitat i proliferació dels esplenòcits *in vitro*. **A)** Percentatge de viabilitat (Annexina V PE<sup>-</sup>, 7-aad<sup>-</sup>) dels esplenòcits després de 24h en cultiu amb concentracions creixents de betametasona [0,1; 1; 2,5; 5; 10; 50; 100 i 1000 nM] (punts grisos) i amb PBS (control, punts negres). La línia representa la mitjana de n≥4 experiments independents (\*p≤0,05 i \*\*p<0,01, test de Dunn, test de Kruskal-Wallis). **B)** Regressió no lineal sigmoïdal de la viabilitat dels esplenòcits i el Log2 de la concentració de la betametasona per determinar la concentració inhibidora 50 (R<sup>2</sup>=0,9887 i IC50=2,755nM). **C)** Percentatge de viabilitat de les cèl·lules T (Annexina V PE<sup>-</sup>, 7-aad<sup>-</sup> dels esplenòcits CD3<sup>+</sup>) i de les cèl·lules B (Annexina V PE<sup>-</sup>, 7-aad<sup>-</sup> dels esplenòcits CD19<sup>+</sup>) després de 72h en cultiu amb betametasona (bet). Les barres blanques corresponen a les cèl·lules T estimulades amb forbol 12-miristat 13-acetat e ionomicina (PMA + IO) juntament amb MC, 1nM, 5nM o 25nM bet. Les barres grises corresponen a les cèl·lules B estimulades amb (PMA + IO) juntament amb MC, 1nM, 5nM o 25nM bet. Els resultats es presenten en rang i mitjana de 5 experiments independents (\*p≤0,05, test de Tukey, Anova de dos factors).

### 5.2.2 La betametasona genera cèl·lules dendrítiques resistents a la maduració

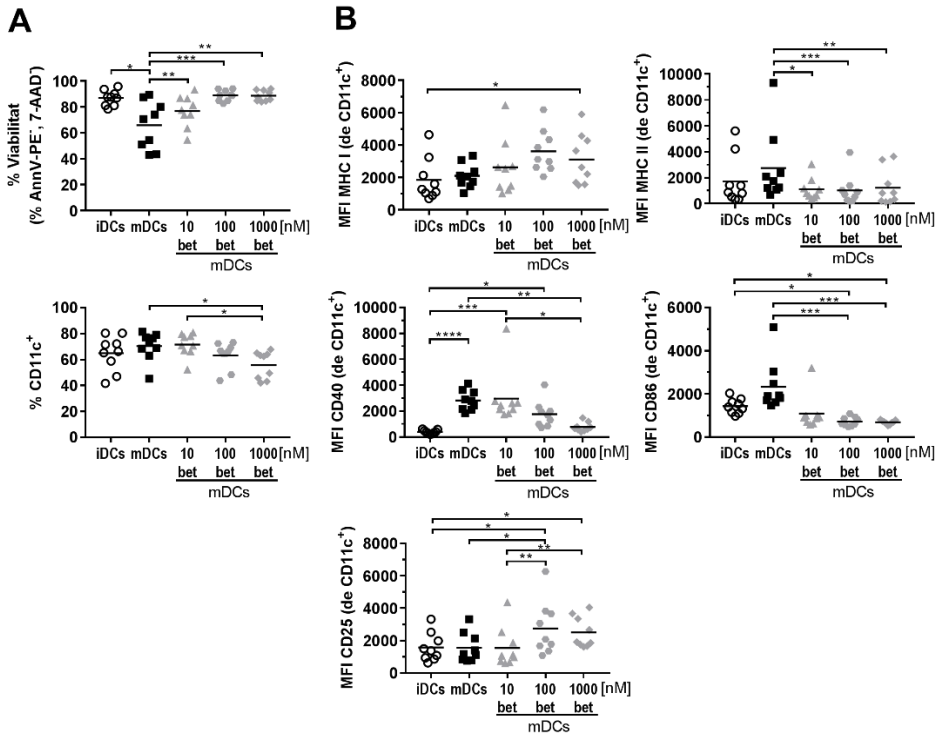
Després d'analitzar l'efecte de la betametasona en els limfòcits T i B de la melsa, es va valorar el seu efecte sobre el fenotip en les DCs. Amb aquesta finalitat, es van diferenciar DCs a partir de precursors de moll d'os amb diferents concentracions de betametasona (10nM, 100nM i 1000nM). Per generar les mDCs es va utilitzar LPS o illes CpG com a estímul de maduració.

En primer lloc, la viabilitat de les DCs no es va veure afectada per la presència de betametasona en el cultiu cel·lular. Tanmateix, sí que es va observar una reducció significativa de la viabilitat en les mDCs sense betametasona respecte a les DCs immadures (iDCs) i les mDCs amb les dosis de 100nM i 1000nM de betametasona ( $p < 0,05$ ) (Figura 8A). Aquest resultat suggereix que l'estímul de maduració estaria induint mort cel·lular en les mDCs i que seria contrarestada per la presència de betametasona. En segon lloc, el rendiment del procés de diferenciació es va trobar afectat per la betametasona de forma significativa en la condició de 1000betDCs quan es compara amb les mDCs i amb les 10betDCs. A més, es va observar una reducció no significativa en l'expressió de CD11c<sup>+</sup> en les iDCs i les 100betDCs respecte a les mDCs (Figura 13A). Les condicions que presenten millor viabilitat són les mateixes que presenten menor percentatge de CD11c<sup>+</sup>.

Un cop determinada la viabilitat, es va analitzar l'expressió en membrana de marcadors de presentació antigènica, coestimulació i activació en DCs. En referència a les molècules de presentació antigènica, es va observar una tendència a incrementar l'expressió del MHC classe I quan comparem les condicions de mDCs i betDCs amb les iDCs, amb un augment estadísticament significatiu entre les 1000betDCs i les iDCs. En l'expressió del MHC classe II es va observar una reducció estadísticament significativa en totes les condicions de betDCs respecte a les mDCs i no es van trobar diferències significatives en comparar amb les iDCs (Figura 13B). Els marcadors de coestimulació que es van analitzar van ser CD40 i CD86. L'expressió de CD40 en les 1000betDCs va ser significativament menor que l'expressió en les mDCs i en les 10betDCs. Les condicions de 100betDCs, 10betDCs i mDCs van induir una major expressió de CD40 respecte a les iDCs. Respecte a l'expressió de CD86 es va observar una reducció estadísticament significativa en les condicions de 100betDCs i 1000betDCs respecte a les mDCs i a les iDCs. Alhora, les 100betDCs i les 1000betDCs van presentar una alta expressió del marcador d'activació CD25, les 100betDCs mostraven un augment estadísticament significatiu respecte a les iDCs, les mDCs i les 10betDCs, mentre que les 1000betDCs mostraven un augment estadísticament significatiu respecte a les iDCs i a les 10betDCs (Figura 13B).

En resum, concentracions elevades de betametasona, (de 100nM a 1000nM) permeten obtenir DCs amb un fenotip semi madur, a causa de la impossibilitat de madurar correctament. Això provoca una reduïda capacitat de coestimulació i baixa expressió de molècules de MHC classe II que impediria l'estimulació eficient dels limfòcits T.

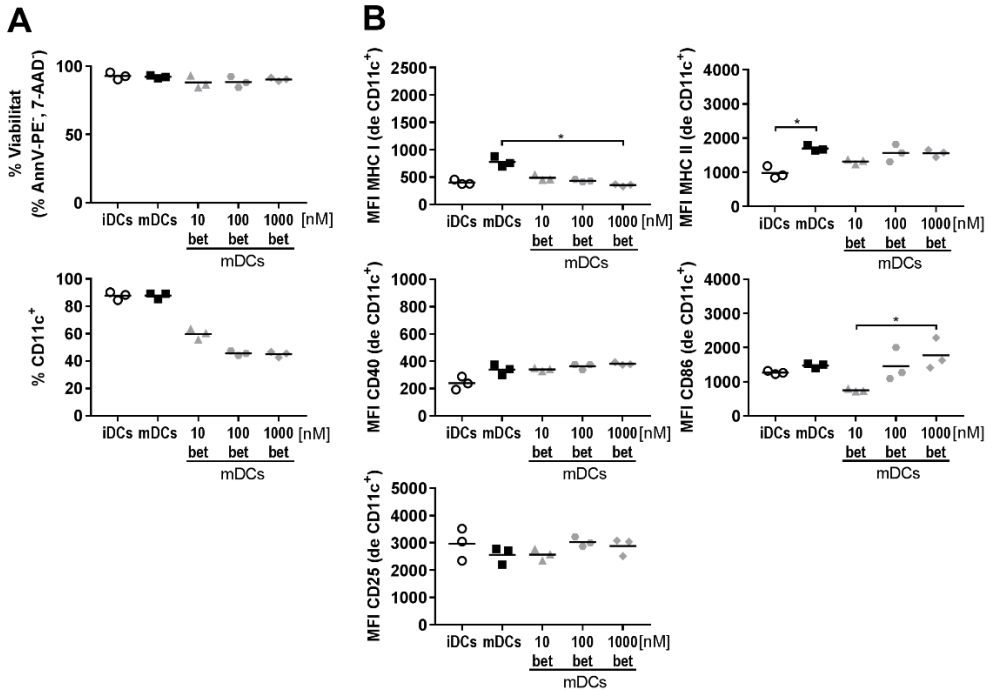




**Figura 13.** Cèl·lules dendrítiques (DCs) derivades de moll d'os en la presència de betametasona presenten un fenotip semi madur després de maduració amb LPS. **A)** Panell superior: percentatge de viabilitat de les DCs (Annexina V PE<sup>-</sup>, 7aad<sup>+</sup> de CD11c<sup>alt</sup>). Panell inferior: eficiència de diferenciació de les DCs des de progenitors de moll d'os (%CD11c<sup>+</sup>). **B)** Mediana de la intensitat de fluorescència (MFI) de l'expressió a la membrana de MHC I, MHC II, CD40, CD86 i CD25 en les DCs (CD11c<sup>+</sup>). Els cercles representen les DCs immadures (iDCs) després de la diferenciació. Els símbols negres i grisos representen les DCs estimulades amb lipopolisacrid (LPS) durant 24h, sense betametasona (bet) (mDCs, quadrats negres), o amb 10nM bet (triangles grisos), 100nM bet (punts grisos), 1000nM bet (rombes grisos). La línia representa la mitjana de 9 experiments independents (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001, test de Dunn, test de Friedman).

Per comprovar que l'efecte observat en les betDCs després de la maduració no era degut al LPS, es va utilitzar un estímul de maduració diferent, les illes CpG. Els resultats obtinguts van ser similar en termes de viabilitat i rendiment de diferenciació (Figura 14A); de fet, el fenotip presenta algunes similituds amb l'observat amb LPS. En la presentació antigènica es va observar una disminució estadísticament significativa del MHC classe I en les 1000betDCs respecte a les mDCs, mentre que els efectes observats en la molècula MHC classe II tendeixen a una menor expressió en les 10betDCs respecte a les mDCs. En aquest cas no es va observar cap efecte sobre el CD40, però tampoc es va observar l'augment entre les condicions de iDCs i mDCs, com en les DCs madurades amb LPS. En l'expressió de CD86 sí que es va apreciar una tendència a disminuir en la condició de 10betDCs respecte a les mDCs. Sorprenentment, a major dosi de betametasona major va ser

l'expressió de CD86 després de l'estímul amb CpG fins a ser estadísticament significativa entre les condicions 10betDCs i 1000betDCs. La molècula CD25 segueix la mateixa tendència que en les DCs madurades amb LPS: es va observar una tendència a augmentar la seva expressió en les condicions de 100betDCs i 1000betDCs respecte a les mDCs, tot i no observar diferències estadísticament significatives (Figura 14B).



**Figura 14.** Les cèl·lules dendrítiques (DCs) derivades de moll d'os en presència de betametasona després d'estimular les DCs amb illes CpG presenten una disminució en l'expressió de molècules de presentació antigènica. **A)** Panell superior: percentatge de viabilitat de les DCs (Annexina V PE<sup>+</sup>, 7aad<sup>-</sup> de CD11c<sup>alt</sup>). Panell inferior: eficiència de diferenciació de les DCs des de progenitors de moll d'os (%CD11c<sup>+</sup>). **B)** Mediana de la intensitat de fluorescència (MFI) de l'expressió a la membrana de MHC I, MHC II, CD40, CD86 i CD25 en les DCs (CD11c<sup>+</sup>). Els cercles representen les DCs immadures (iDCs) després de la diferenciació. Els símbols negres i grisos representen les DCs estimulades amb illes de seqüències riques en citocines i guanines (illes CpG) durant 48h, sense betametasona (bet) (mDCs, quadrats negres), o amb 10nM bet (triangles grisos), 100nM bet (punts grisos), 1000nM bet (rombes grisos). La línia representa la mitjana de 3 experiments independents (\*p < 0,05, test de Dunn, test de Friedman).

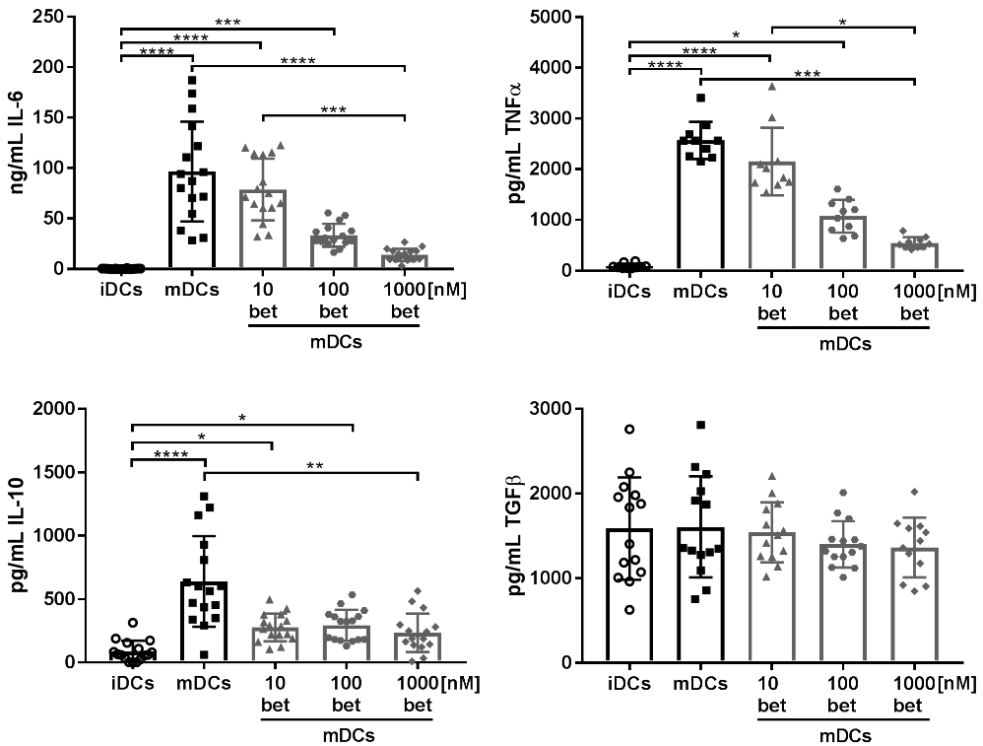
En conjunt, es demostra la capacitat de la betametasona per aturar el procés de maduració de les DCs independent de l'estímul utilitzat, reduint la seva capacitat d'expressió en membrana de molècules cabdals per a l'activació de la resposta immunitària en els limfòcits T.

### 5.2.3 La betametasona altera la secreció de citocines en les cèl·lules dendrítiques

Per tal de comprovar els efectes de la betametasona sobre la capacitat de les DCs de secretar citocines es van utilitzar els sobrenedants dels cultius per quantificar diverses citocines mitjançant ELISA.

Les citocines analitzades van ser les següents: IL-6, IL-10, IL-17, TNF $\alpha$  i TGF $\beta$ . En la IL-6 es va observar un augment significatiu de la secreció quan comparem les mDCs amb les iDCs. En Les 10betDCs i 100betDCs també es va observar un augment significatiu respecte a les iDCs. Es va observar una tendència a reduir la secreció a mesura que s'augmenta la dosi de betametasona utilitzada per a generar les DCs. La màxima reducció de la secreció es va observar de forma significativa en les 1000betDCs respecte a les mDCs i a les 10betDCs. En el TNF $\alpha$ , els resultats són molt similars als obtinguts en la IL-6, ja que es va observar un augment significatiu de la secreció de les mDCs respecte a les iDCs, però al mateix temps les betDCs tendeixen a reduir la secreció d'aquesta citocina a mesura que augmenta la dosi utilitzada en cultiu. Es van trobar diferències estadísticament significatives en les 10betDCs i en les 100betDCs respecte a les iDCs. A més, es va observar una reducció estadísticament significativa en la secreció de TNF $\alpha$  en les 1000betDCs respecte a les mDCs i les 10betDCs. En la IL-10 també es va observar un augment significatiu en la secreció de les mDCs respecte a les iDCs. De la mateixa manera les betDCs tendeixen a tenir uns nivells de secreció menors que les mDCs, però en aquest cas no es va observar una disminució depenent de la dosi empleada de betametasona durant els cultius. La concentració de IL-10 és molt similar entre les 3 condicions de betDCs però només es va observar una reducció significativa en les 1000betDCs en comparació a les mDCs. Es va observar un augment significatiu de la secreció d'IL10 en les 10betDCs i les 100betDCs respecte a les iDCs. En el TGF $\beta$ , es va detectar la secreció d'aquesta citocina, però no es van observar cap tipus de canvis en cap de les condicions comparades entre elles. Ni la maduració, ni la betametasona van afectar la secreció d'aquesta citocina (Figura 15). En la IL-17 no es va detectar la presència d'aquesta citocina en els sobrenedants de cultius amb únicament DCs.

Vistes les grans diferències trobades en algunes de les citocines entre les condicions de iDCs i mDCs, es va analitzar el perfil que s'obtenia per a cada condició en percentatges (Figura 16). En les iDCs es va observar una clara predominança del TGF $\beta$  (75%) mentre que la IL-6 només representa un 15% del total. En aquesta condició tant el TNF $\alpha$  com la IL-10 se secreten però en poca quantitat (5%). En l'altre extrem trobem la condició de les mDCs, en la qual es va observar una clara i dominant secreció d'IL-6 (95%) amb una mínima secreció de TNF $\alpha$  i TGF $\beta$  i la IL-10 pràcticament inexistent (>1%) (Figura 16). En les condicions de betDCs, tot i que la citocina predominant segueix sent la IL-6, es va observar que a major concentració

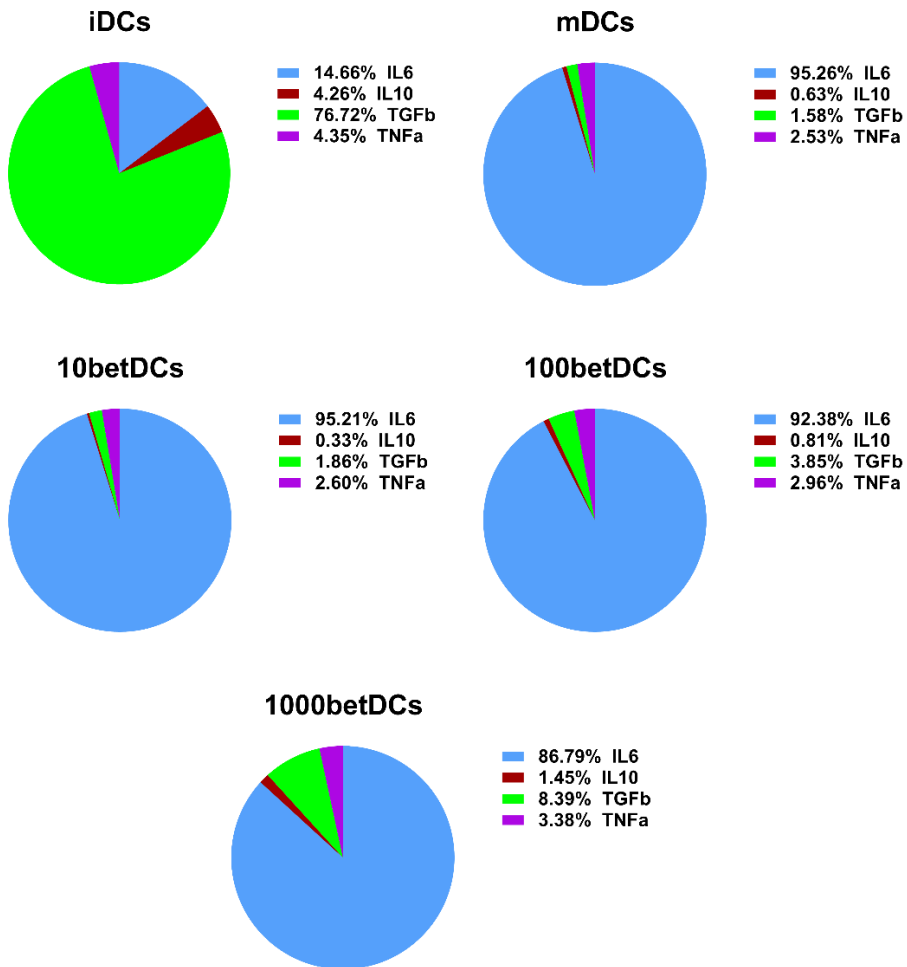


**Figura 15. La secreció de IL-6, TNF $\alpha$  i IL-10 disminueix en les cèl·lules dendrítiques (DCs) tractades amb betametasona.**

Quantificació de la secreció de IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10 i TGF $\beta$  mitjançant la tècnica d'ELISA en els sobrenadants de DCs immadures (iDCs) després de la diferenciació (cercles). Els símbols negres i grisos representen les DCs estimulades amb lipopolisacàrid (LPS) durant 24h, sense betametasona (bet) (mDCs, quadrats negres), o amb 10nM bet (triangles grisos), 100nM bet (punts grisos), 1000nM bet (rombes grisos). Els resultats estan expressats com a mitjana + desviació estàndard d'una N=14 (\*p≤0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001, test de Dunn, test de Friedman).

de betametasona menor percentatge d'IL-6 respecte al total de les altres citocines. A més, la citocina que més va augmentar respecte a la condició mDCs és el TGF $\beta$ , que va passar d'un 1,6% fins a un 8,4% en la condició de 1000betDCs. Tot i que la secreció de TNF $\alpha$  i d'IL-10 es veuen afectades per la betametasona, els percentatges augmenten aproximadament un punt percentual respecte al total (Figura 16), ja que la citocina més afectada per la betametasona és la IL-6 (Figura 15) (100 vegades menys secreció en la condició 1000betDCs respecte a les mDCs).

En resum, la betametasona redueix la secreció de les citocines que es troben estimulades per la maduració de les DCs. Això recolza que la betametasona està causant una resistència a la maduració, però en cap cas reverteix o evita totalment el pas de iDCs a mDCs.



**Figura 16.** Canvis en el perfil de secreció de citocines degut a la maduració i a la betametasona. Percentatge de IL-6 (Blau), IL-10 (Vermell fosc), TGFβ (Verd) i TNFα (Lila) respecte a la suma total de les 4 citocines secretades en les condicions de iDCs, mDCs, 10betDCs, 100betDCs i 1000betDCs.

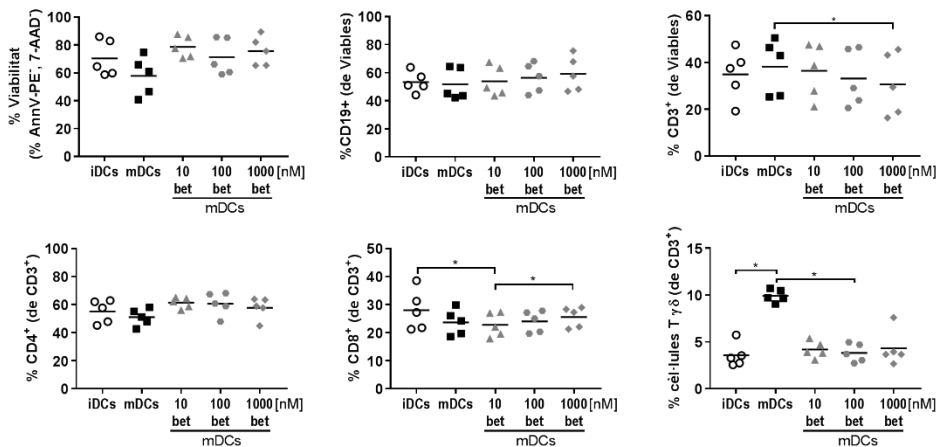
#### 5.2.4 La betametasona inhibeix la proliferació de limfòcits T CD3 γδ i la seva capacitat de produir IL-17

Per tal d'avaluar la funcionalitat de les DCs generades amb betametasona es va realitzar un cultiu conjunt amb esplenòcits de ratolí NOD marcats amb CFSE per valorar la seva proliferació autòloga. Les DCs van ser prèviament estimulades amb pèptids d'insulina i LPS. Les cèl·lules van estar en cultiu 4 dies abans de ser analitzades per citometria de flux.

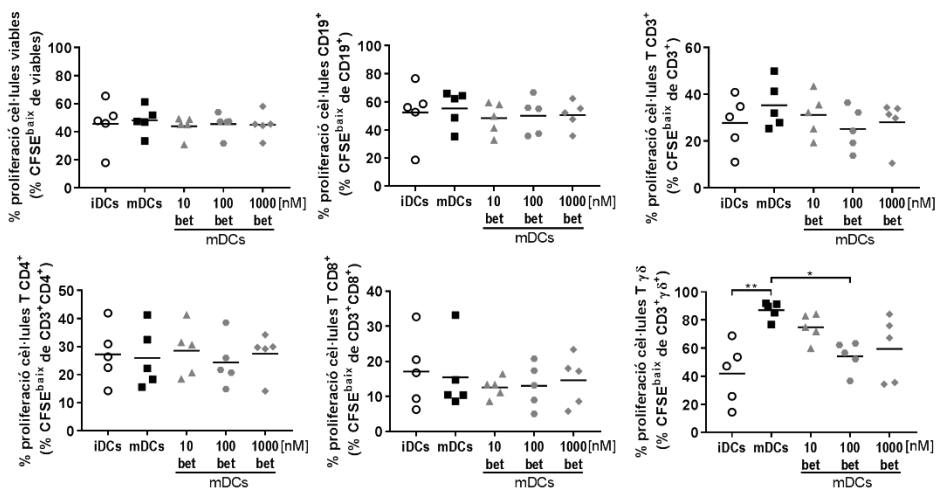
Es van analitzar diferents sub poblacions limfoides. No es van trobar diferències en el percentatge ni en la proliferació dels limfòcits B. En els limfòcits T CD3<sup>+</sup> es va

trobar una disminució estadísticament significativa del percentatge en la condició 1000betDCs respecte a les mDCs, però no es va observar cap diferència en la proliferació d'aquestes cèl·lules. De forma similar, no es va observar cap diferència en el percentatge ni en la proliferació dels limfòcits T CD4<sup>+</sup>, però sí que es van trobar diferències estadísticament significatives en el percentatge dels limfòcits T CD8<sup>+</sup>, on es va observar una disminució en la condició de 10betDCs respecte a les iDCs i a les 1000betDCs (Figura 17A i B). Sorprenentment, el percentatge i la proliferació dels limfòcits T  $\gamma\delta$  es va observar significativament reduïda en la condició 100betDCs respecte a les mDCs i també es va observar aquesta reducció en la condició iDCs respecte a les mDCs (Figura 17A i B). Aquest augment en el percentatge de limfòcits T  $\gamma\delta$  no es va detectar en els cultius amb PMA+IO (dades no mostrades), per tant, les mDCs induirien específicament la proliferació de la població de limfòcits T  $\gamma\delta$  i no dels altres tipus de limfòcits T o B.

**A**



**B**



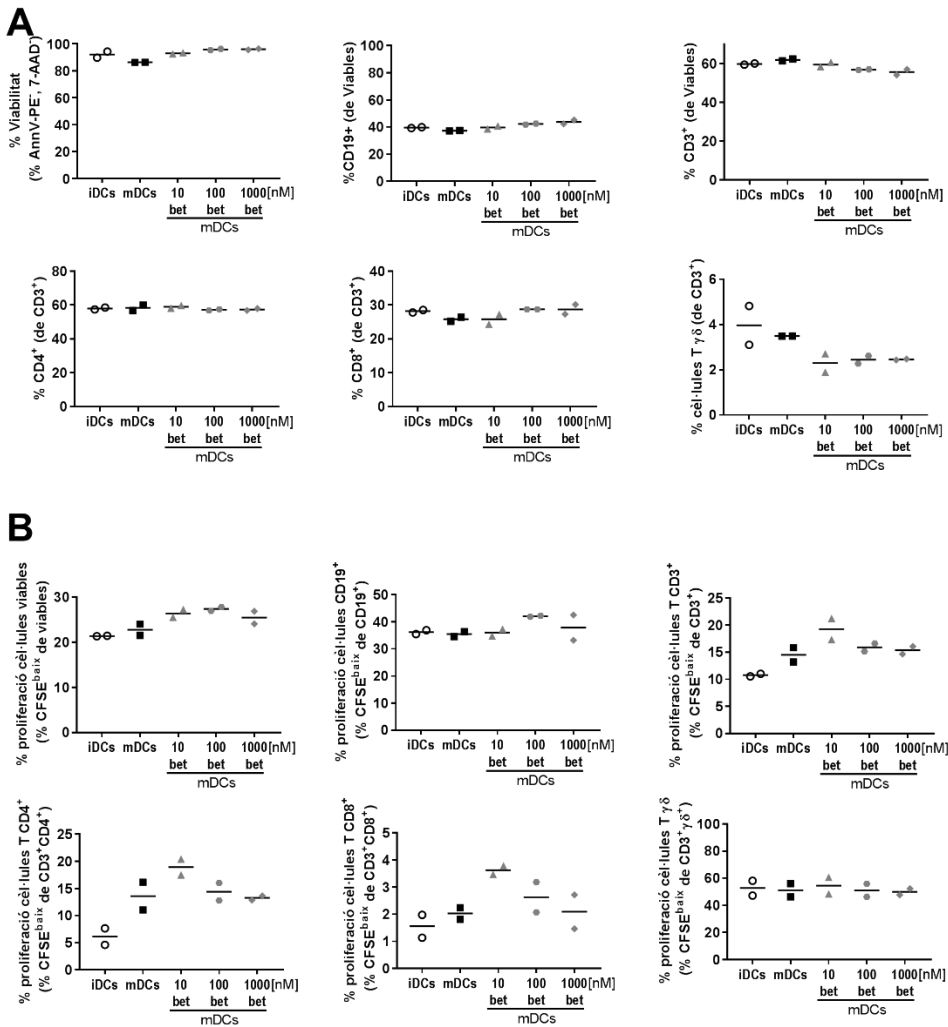
**Figura 17. Capacitat de les cèl·lules dendrítiques (DCs) diferenciades amb betametasona d'induir proliferació limfocitària autòloga.** Les DCs van ser carregades amb insulina (20 µg/ml) i cultivades amb esplenòcits a una relació DCs:esplenòcits de 1:10 durant 4 dies. **A)** Percentatge d'esplenòcits, limfòcits B, limfòcits T CD4 i CD8 i limfòcits T γδ després de l'estimulació amb DCs. **B)** Percentatge de proliferació autòloga d'esplenòcits, limfòcits B, limfòcits T CD4 i CD8 i limfòcits T γδ (% CFSE<sup>baix</sup>) després de l'estimulació amb les DCs. Els cercles representen les DCs immadures (iDCs) després de la diferenciació. Els símbols negres i grisos representen les DCs estimulades amb lipopolisacàrid (LPS) durant 24h, sense betametasona (bet) (mDCs, quadrats negres), o amb 10nM bet (triangles grisos), 100nM bet (punts grisos), 1000nM bet (rombes grisos). La línia representa la mitjana de 5 experiments independents (\*p<0,05, test de Dunn, test de Friedman)

Per comprovar i validar l'efecte induït per la betametasona sobre les DCs es va realitzar el mateix cocultiu amb esplenòcits amb les DCs madurades amb illes CpG. Només es van trobar una tendència a disminuir en el percentatge de limfòcits T γδ entre la condició de betDCs i les mDCs i no es van observar diferències en la resta de poblacions limfoides. Al mateix temps, s'observa una tendència a que les betDCs indueixin una major proliferació en els limfòcits T en comparació amb les mDCs (Figura 18A i B), però quan comparem amb els percentatges obtinguts amb les DCs madurades amb LPS s'observa que el percentatge de proliferació general és menor quan s'utilitzen les illes CpG com a estímul de maduració. Es va obtenir fins a un 35% de proliferació dels limfòcits T CD3<sup>+</sup> amb LPS (Figura 17B) en front a un 15% de proliferació dels limfòcits T CD3<sup>+</sup> amb illes CpG (Figura 18B), indicant la menor potència de l'estímul (com s'ha descrit en l'apartat 5.2.2) en la capacitat d'induir l'expressió de CD40 i CD86 en el fenotip de les DCs madurades amb les illes CpG.

Per determinar si les mDCs estaven activant directament els limfòcits T γδ, es va analitzar la secreció d'una citocina típicament produïda per aquesta subpoblació, la IL-17, que alhora és important per a l'inici del procés inflamatori. Tanmateix, també es van analitzar altres citocines proinflamatòries com IL-6 i TNFα. Es va observar una disminució estadísticament significativa de la secreció d'IL17 en les condicions 100betDCs i 1000betDCs respecte a les mDCs. També es va observar clarament la tendència a disminuir en la condició iDCs i 10betDCs respecte a les mDCs encara que no es va trobar significança estadística. Respecte a la IL-6 es van observar uns efectes similars a la IL-17, es a dir, es va assolir una disminució estadísticament significativa de la secreció en les condicions 100betDCs i 1000betDCs respecte a les mDCs i una tendència a disminuir la secreció entre les condicions de iDCs i 10betDCs respecte a les mDCs. Aquests resultats segueixen en la mateixa línia de la secreció d'IL-6 per part de les DCs soles. Per tant, és possible que la IL-6 estigui produïda per les DCs del cocultiu. No es van observar diferències entre cap de les condicions en la secreció de TNFα (Figura 19).

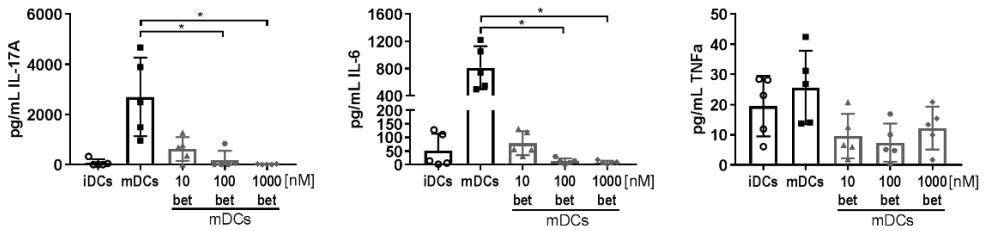
En resum, les mDCs indueixen la proliferació dels limfòcits T γδ i la secreció d'IL-17. Aquesta proliferació es veu disminuïda quan les DCs són generades amb

betametasona disminuint tant el nombre de cèl·lules com la seva capacitat de secretar citocines.



**Figura 18.** La maduració de les cèl·lules dendrítiques (DC) amb illes CpG és similar però menys potent que la maduració amb LPS. Les DC van ser carregades amb insulina (20 µg/ml) i cultivades amb esplenòcits a una relació DC:esplenòcits de 1:10 durant 4 dies. **A)** Percentatge d'esplenòcits, limfòcits B, limfòcits T CD4 i CD8 i limfòcits T  $\gamma\delta$  després de l'estimulació amb DCs. **B)** Percentatge de proliferació autòloga d'esplenòcits, limfòcits B, limfòcits T CD4 i CD8 i limfòcits T  $\gamma\delta$  (% CFSE<sup>baix</sup>) després de l'estimulació amb les DCs. Els símbols negres i grisos representen les DCs estimulades amb illes de seqüències riques en citocines i guanines (illes CpG) durant 48h, sense betametasona (bet) (mDCs, quadrats negres), o amb 10nM bet (triangles grisos), 100nM bet (punts grisos), 1000nM bet (rombes grisos). La línia representa la mitjana de 2 experiments independents (NS, test de Dunn, test de Friedman).





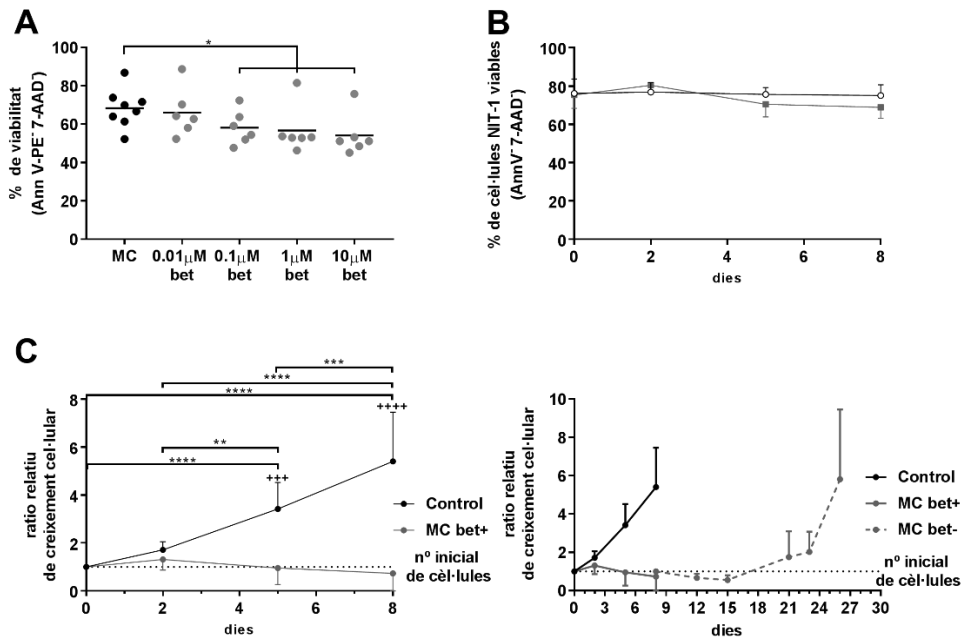
**Figura 19.** La secreció de citocines inflamatòries disminueix en cocultius amb cèl·lules dendrítiques (DCs) generades amb betametasona. Quantificació de la secreció de IL-17, IL-6 i TNF $\alpha$  mitjançant la tècnica d'ELISA dels sobrenedants dels cocultius d'esplenòcits amb DCs durant 4 dies. Els cercles representen les DCs immadures (iDCs) després de la diferenciació. Els símbols negres i grisos representen les DCs estimulades amb lipopolisacàrid (LPS) durant 24h, sense betametasona (bet) (mDCs, quadrats negres), o amb 10nM bet (triangles grisos), 100nM bet (punts grisos), 1000nM bet (rombes grisos). Els resultats estan expressats com a mitjana + desviació estàndard de 5 experiments independents (\* $p < 0,05$ , test de Dunn, test de Friedman).

### 5.2.5 La betametasona induïx quiescència en la línia cel·lular NIT-1

Per determinar els efectes de la betametasona en la cèl·lula diana de la DT1, es va utilitzar una línia cel·lular  $\beta$  pancreàtica derivada del ratolí NOD, NIT-1, que va ser exposada a betametasona a concentracions creixents per valorar els efectes en la viabilitat. També es van cultivar aquestes cèl·lules amb betametasona de forma continuada durant 8 dies per observar l'efecte sobre la seva proliferació.

Després de 48 hores de cultiu es va observar una reducció estadísticament significativa de la viabilitat de caràcter dosi dependent des de la concentració de 0,1 $\mu$ M fins a la concentració de 10 $\mu$ M de betametasona respecte a la condició control (Figura 20A). Seguidament es va comprovar l'efecte sobre la capacitat d'expansió de la línia cel·lular en presència de betametasona. Les cèl·lules van ser exposades a 0,1 $\mu$ M de betametasona durant 8 dies. Durant aquests 8 dies la viabilitat entre el grup control i el grup tractat va ser similar (Figura 20B). Es va observar una disminució estadísticament significativa en la capacitat de proliferació d'aquestes cèl·lules i mentre que el cultiu control va doblar el nombre de cèl·lules cada 4 dies, les cèl·lules del cultiu tractat amb betametasona no van augmentar en cap moment (Figura 20C). Sorprenentment, les cèl·lules NIT-1 tractades amb betametasona van recuperar la seva capacitat de creixement després de 14 dies de cultiu sense betametasona, tornant a arribar a la fase exponencial de creixement (Figura 20C).

Així doncs, la betametasona té capacitat de reduir la viabilitat i la proliferació de la línia cel·lular NIT-1 però de manera reversible.



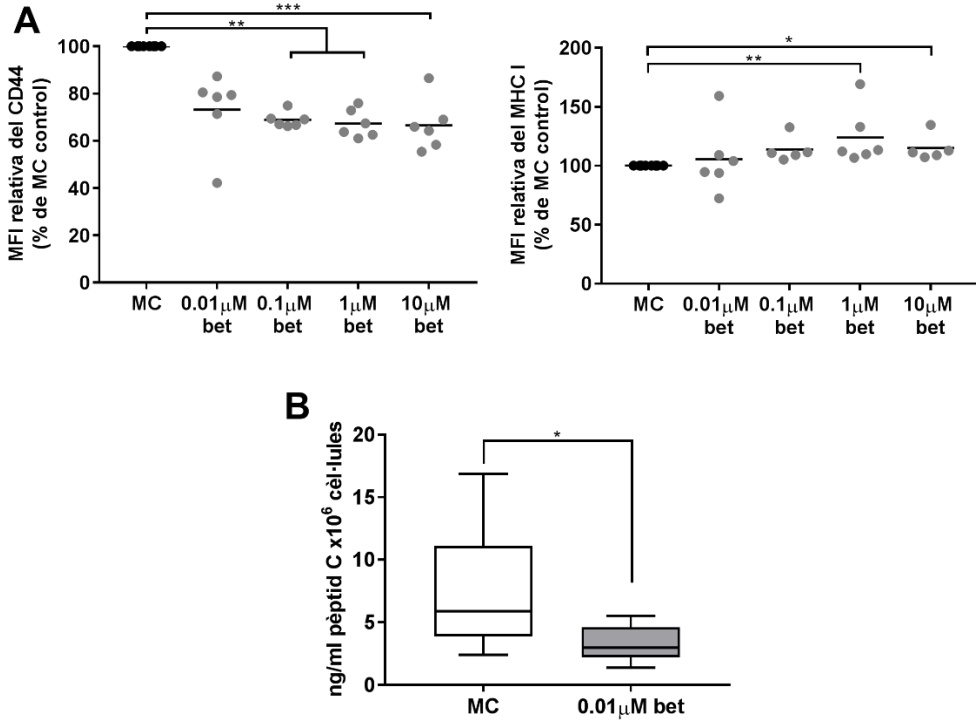
**Figura 20. La betametasona afecta la viabilitat i el creixement de la línia cel·lular NIT-1 de forma reversible.** **A)** Percentatge de cèl·lules NIT-1 viables (Annexina V i 7AAD) després de 48h de cultiu amb medi complet (MC, punts negres) o amb MC i diferents concentracions de betametasona (bet, punts grisos). La línia mostra la mitjana de 6 experiments independents (\* $p \leq 0,05$ , test de Dunn, Kruskal-Wallis). **B)** Percentatge de cèl·lules NIT-1 viables (Annexina V i 7AAD) durant els 8 dies de cultiu. **C)** Panell esquerre: rati relatiu de creixement cel·lular de les cèl·lules NIT-1 durant 8 dies de cultiu amb la presència de 0,1µM bet. Panell dret: rati relatiu de creixement cel·lular de les cèl·lules NIT-1 durant 26 dies de cultiu amb la presència de 0,1µM bet fins a dia 8 i sense bet fins a dia 26 (MC bet-). Els resultats estan expressats com a mitjana + desviació estàndard del nombre relatiu de cèl·lules ( $n=6$  experiments independents), sent aquest valor relatiu normalitzat amb el número de cèl·lules a dia 0 (\*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  per comparacions entre condicions; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  per comparacions dins la mateixa condició)

### 5.2.6 La betametasona altera el fenotip i la secreció d'insulina en la línia cel·lular NIT-1

Una part important de l'autoimmunitat és la presència de certes molècules necessàries per al reconeixement per part dels limfòcits T autoreactius en la membrana de la cèl·lula  $\beta$ . Dues molècules importants són el CD44 i el MHC classe I, ambdues necessàries per a l'establiment de la sinapsi immunològica (limfòcit T amb la cèl·lula  $\beta$ ) que permetrà l'atac autoimmunitari. L'expressió d'aquestes 2 molècules de membrana va ser avaluada 48h després de tractar amb betametasona les cèl·lules NIT-1.

Es va observar una reducció estadísticament significativa en l'expressió en membrana de CD44 en les concentracions de 0,1µM, 1µM i 10µM de betametasona respecte al MC. En canvi, en l'expressió de MHC classe I s'observa un increment

estadísticament significatiu en les concentracions d'1 $\mu$ M i 10 $\mu$ M de betametasona respecte al MC (Figura 21A).



**Figura 21. La betametasona altera l'expressió de molècules de membrana i el metabolisme de la línia cel·lular NIT-1.** **A)** Mediana de la intensitat de fluorescència (MFI) de l'expressió a la membrana de CD44 i MHC I en la línia cel·lular NIT-1 cultivades durant 48h amb medi complet (MC, punts negres) o amb diferents concentracions de betametasona (bet, punts grisos), dades normalitzades respecte la condició de MC. La línia representa la mitjana de MFI relativa de n=6 experiments (\*p $\leq$ 0,05, \*\*p $\leq$ 0,01, \*\*\*p $\leq$ 0,001, test de Dunn, test de Friedman) **B)** Concentració de pèptid C en el sobrenedant de cèl·lules NIT-1 cultivades 48h amb MC (caixa blanca) o amb 0,01 $\mu$ M bet (caixa gris). Els resultats estan representats com a ng/ml x 10<sup>6</sup> cèl·lules i són mostrats amb un diagrama de caixa (\*p $\leq$ 0,05, test de Mann-Whitney).

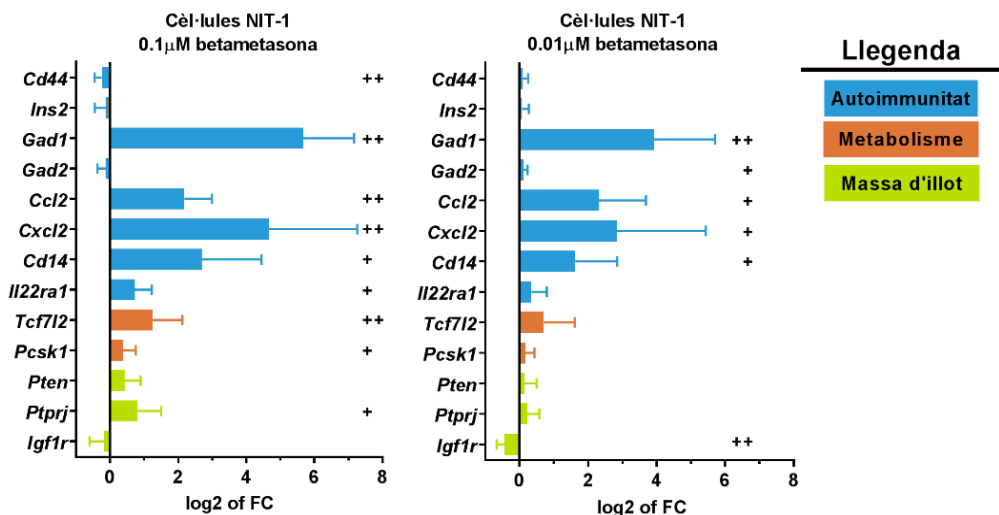
Juntament amb el fenotip es va avaluar la capacitat d'aquesta línia cel·lular de secretar Insulina. Després de 48h de tractament amb betametasona es va recollir el sobrenedant per determinar la concentració de pèptid C. Es va observar una disminució significativa en la concentració de pèptid C en el cultiu per l'efecte de la betametasona (0,01 $\mu$ M) respecte a la condició control (Figura 21B).

No només la viabilitat i la proliferació de la cèl·lula  $\beta$  es veuen afectats per la betametasona, sinó que a més tenim clars efectes sobre el fenotip i la seva capacitat de secreció d'insulina.

### 5.2.7 La betametasona modifica la transcripció gènica en la línia cel·lular NIT-1

Seguint en la línia de determinar els canvis produïts per la betametasona en la línia cel·lular NIT-1 es va voler analitzar els efectes a nivell de transcriptoma de la betametasona, ja que el seu receptor pot inhibir o induir l'expressió de certs gens. Per tal de determinar els efectes, es va realitzar una cerca bibliogràfica de gens importants en la DT1 i una cerca en una base de dades de gens possiblement afectats pel RG. Alguns dels gens més rellevants van ser seleccionats i la seva expressió gènica analitzada utilitzant la tècnica de RT-PCR en temps real.

En total es van seleccionar 13 gens diferents: *Ins2*, *Gad1*, *Gad2* (autoantígens), *Cd44*, *Cd14*, *Ccl2*, *Il22ra1*, *Cxcl2* (relacionats amb autoimmunitat) i *Tcf7l2*, *Pcsk1*, *Pten*, *Igf1*, *Ptprj* (relacionats amb metabolisme i massa de cèl·lula  $\beta$  a l'illot). Es va determinar l'efecte de la betametasona en 2 concentracions diferents. Utilitzant 0,1 $\mu$ M de betametasona es va observar que dels 13 gens, l'expressió gènica estava significativament sobre-expressada (*Gad1*, *Cd14*, *Ccl2*, *Il22ra1*, *Cxcl2*, *Tcf7l2*, *Pcsk1* i *Ptprj*); i el *Pten* mostrava una tendència a la sobre-expressió respecte a la condició



**Figura 22.** El tractament amb betametasona modifica l'expressió gènica de la línia cel·lular NIT-1. Expressió gènica relativa de 13 gens seleccionats en cèl·lules NIT-1 després del tractament amb diferents concentracions de betametasona (gràfica esquerra: 0,1 $\mu$ M betametasona; gràfica dreta: 0,01 $\mu$ M betametasona,  $n \geq 8$ ) analitzat per qRT-PCR. L'expressió gènica va ser normalitzada amb el gen *Gapdh*. Els resultats estan expressats com a mitjana + desviació estàndard del  $\text{Log}_2$  del canvi de l'increment (FC) respecte a la condició de MC com a valor estàndard (\* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$ , test de Wilcoxon).

de MC. Dels 4 gens restants, només es va trobar significativament reprimida l'expressió de *Cd44* respecte a la condició de MC i la resta de de gens (*Ins2*, *Gad2*

i *Igf1r*) mostraven una tendència a reprimir la seva expressió respecte a la condició de MC (Figura 22). Utilitzant 0,01µM de betametasona, només 5 gens van presentar una sobre-expressió significativament estadística respecte a la condició de MC (*Gad1*, *Gad2*, *Ccl2*, *Cxcl2* i *CD14*), mentre que els altres 7 gens presenten una tendència a estar sobre-expressats (*Il22ra1*, *Tcf7l2*, *Pcsk1* i *Ptprj*) o no presenten diferències respecte a la condició de MC (*Cd44*, *Ins2* i *Pten*). El gen *Igf1r* es va trobar significativament reprimat respecte a la condició de MC (Figura 22).

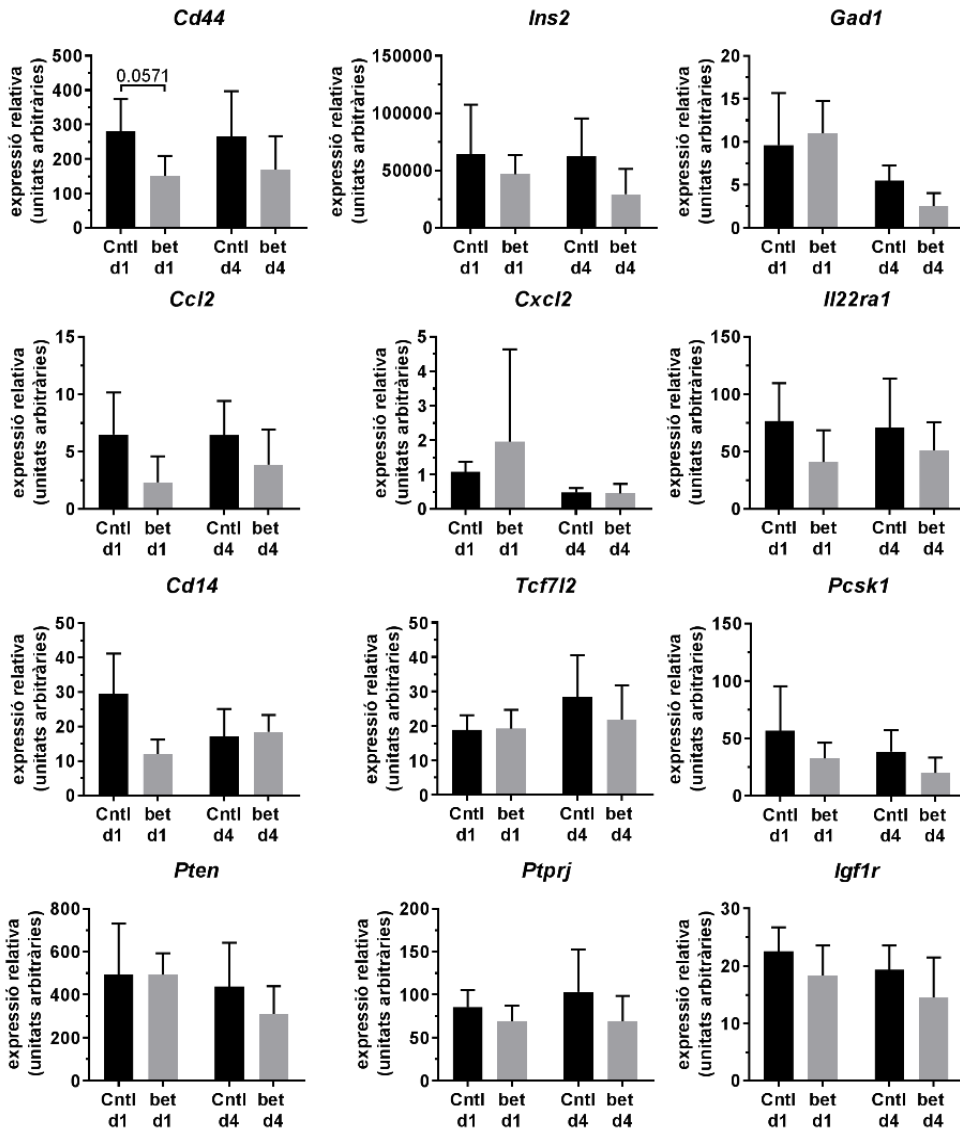
Aquests resultats confirmen a nivell de transcriptoma els resultats previs observats en el fenotip de línia cel·lular NIT-1. La disminució en el *Cd44* i la *Ins2* en la concentració més elevada de betametasona confirmen l'efecte de la betametasona a diferents nivells del metabolisme de les proteïnes sobre aquesta línia cel·lular.

### 5.2.8 Validació de la RT-PCR en pàncrees i illots murins

Observats els efectes de la betametasona sobre la línia cel·lular NIT-1 es van validar els resultats en el teixit diana de DT1. Per tal d'assolir-ho es van utilitzar tant els pàncrees dels nounats a d1 i d4, com illots de Langerhans aïllats de ratolins NOD adults i posteriorment cultivats durant 48 hores amb betametasona. Es van analitzar els mateixos gens que amb les cèl·lules NIT-1 i, a més, *Ki67* (replicació cel·lular), *Manf* i *Glis3* (relacionats amb resistència a l'apoptosi)

Tot i que en cap cas es van observar diferències significatives, en pàncrees total, la tendència observada va ser de repressió de l'expressió gènica. Només *Gad1* i *Cxcl2* presenten una tendència a estar sobre-expressats respecte als controls a d1. Per altra banda, no es van observar diferències entre control i betametasona a d1 en els gens *Tcf7l2* i *Pten*. El gen *Cd44* presenta una tendència de repressió de l'expressió gènica respecte als pàncrees controls. A d4 l'efecte de repressió és molt més clar, només en el gen *Cxcl2* i el *Cd14* es van trobar uns nivells d'expressió similars entre les dues condicions. La resta de gens en la condició de betametasona, tendeixen a tenir una menor expressió respecte als controls. *Gad2* no va ser detectat ni a d1 ni a d4 en el pàncrees total, però en pàncrees, el fet de tenir menor expressió d'un gen pot ser degut a una repressió per part del tractament o a un menor nombre de cèl·lules  $\beta$  (Figura 23).

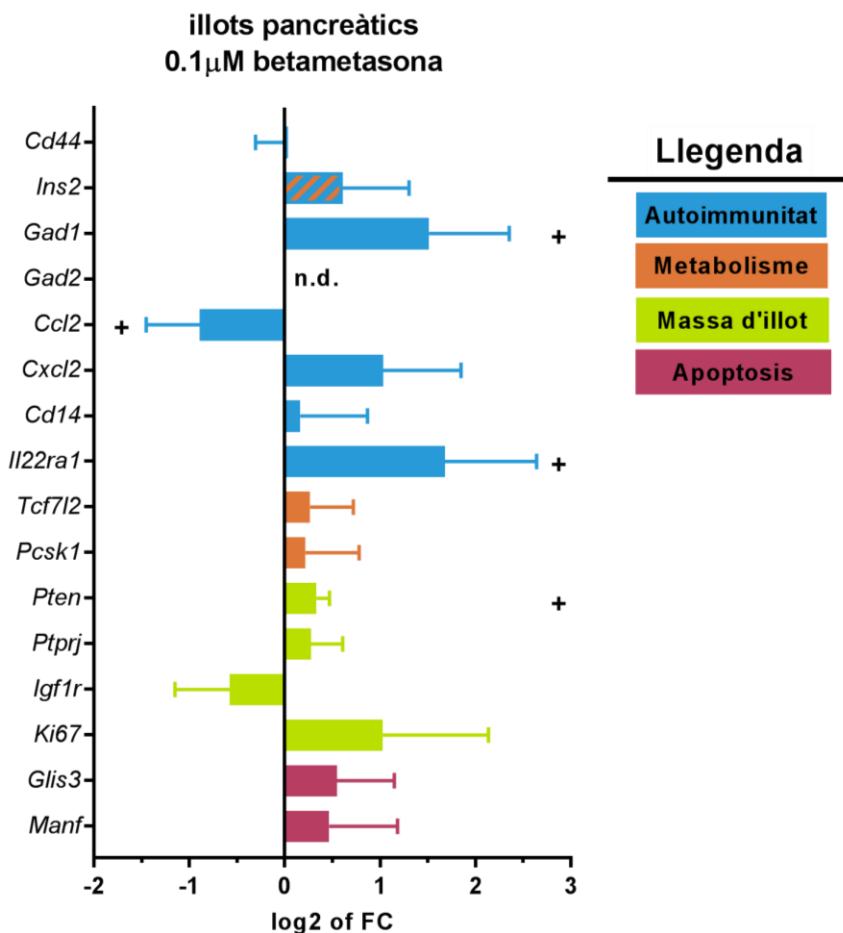
Per confirmar-ho es van purificar illots pancreàtics de ratolins NOD sans, que contenen aproximadament un 80% de cèl·lula  $\beta$ . Si comparem el perfil trobat en la línia cel·lular NIT-1 amb l'obtingut als illots es veu que segueix predominant la sobre-expressió de la majoria de gens de forma similar a la línia cel·lular NIT-1. En total, dels 13 gens anteriorment analitzats en les cèl·lules NIT-1 es van trobar en tendència a sobre-expressar els gens de l'*Ins2*, *Cxcl2*, *Cd14*, *Tcf7l2*, *Pcsk1* i *Ptprj* respecte a la



**Figura 23.** El tractament amb betametasona tendeix a modificar l'expressió gènica en els pàncrees de les cries a d1 i d4. Expressió gènica relativa de 12 gens seleccionats en pàncrees de les cries de ratolí a d1 i d4 després del tractament prenatal amb 0,1mg de betametasona (barres grises) o amb PBS (barres negres) a ratolins femella gestants. Analitzat per qRT-PCR. L'expressió gènica va ser normalitzada amb el gen *Gapdh*. Els resultats estan expressats com a mitjana + desviació estàndard de la expressió gènica relativa (Test de Mann-Whitney).

condició de MC. A més, es van trobar sobre-expressats significativament els gens *Gad1*, *Il22ra1* i *Pten*. Tot i ser el mateix nombre de gens sobre-expressats que en la línia cel·lular, trobem 2 canvis importants respecte a les cèl·lules NIT-1, la *Ins2* es va trobar que tendeix a estar sobre-expressada i el *Ccl2* es va trobar significativament reprimint en els illots (Figura 24). El gen *Igf1r* va mostrar una tendència a reprimir

l'expressió gènica de manera similar a les cèl·lules NIT-1 però sense arribar a una diferència significativament estadística. En els illots, el gen *Cd44* no sembla que es vegi afectat per la betametasona, ja que les diferències amb la condició de MC són pràcticament nul·les. Sobre el *Gad2* l'expressió en l'illot era tan reduïda que la seva detecció no va ser possible (n.d. Figura 24). Per avaluar el possible efecte de la betametasona en la proliferació de les cèl·lules  $\beta$  de l'illot es va determinar l'expressió gènica del *Ki67* i aquest gen va mostrar una tendència a estar sobre-expressat en la condició amb betametasona respecte a la condició de MC. De forma similar, es va avaluar l'expressió gènica de *Glis3* i *Manf*, gens implicats en l'apoptosi cel·lular. Els dos gens es van mostrar una tendència a estar sobre-expressats en el grup tractat respecte al grup de MC (Figura 24).



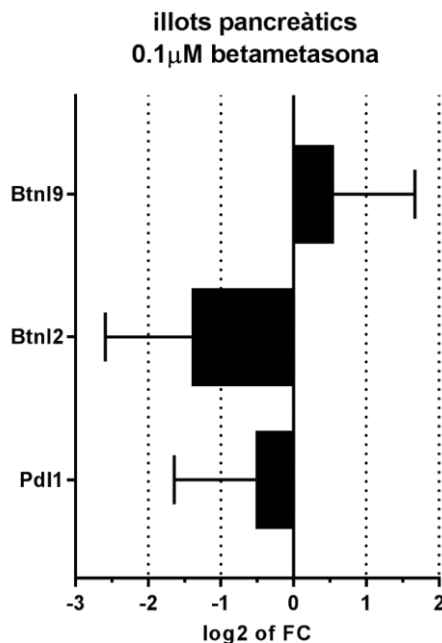
**Figura 24.** El tractament amb betametasona modifica l'expressió gènica en els illots pancreàtics del ratolí NOD. Expressió gènica relativa de 16 gens seleccionats en illots aïllats de ratolí NOD tractats *in vitro* amb 0,1 $\mu$ M de betametasona durant 48h. Analitzat per qRT-PCR. L'expressió gènica va ser normalitzada amb el gen *Gapdh*. Els resultats estan expressats com a mitjana + desviació estàndard del Log<sub>2</sub> del canvi de l'increment (FC) respecte a la condició de MC com a valor estàndard (no detectable (n.d.); \*p $\leq$ 0,05, test de Wilcoxon).

En resum, la majoria de gens seleccionats es comporten de manera similar entre les cèl·lules NIT-1 i les cèl·lules  $\beta$  dels illots. Les diferències en l'expressió d'alguns gens poden ser degudes a l'origen tumoral de la línia cel·lular respecte a les cèl·lules de l'illot.

### 5.2.9 La betametasona altera l'expressió de gens que codifiquen per molècules immunomoduladores en illots murins

Tenint en compte els efectes de la betametasona en l'expressió de diferents gens relacionats amb el sistema immune i l'autoimmunitat es va voler comprovar si l'efecte protector podia ser degut a la sobre-expressió d'alguna molècula amb capacitat immunomoduladora. Els gens seleccionats van ser el *Pd11*, *Btnl2* i *Btnl9*.

Tot i que les diferències no són estadísticament significatives, es va observar una clara tendència a reprimir l'expressió dels gens *Pd11* i *Btnl2* respecte a la condició de MC, mentre que el gen *Btnl9* va mostrar una tendència a la sobre-expressió (Figura 25).



**Figura 25.** El tractament amb betametasona tendeix a alterar l'expressió de gens immunomoduladors en els illots pancreàtics del ratolí NOD. Expressió gènica relativa de 3 gens seleccionats en illots aïllats de ratolí NOD tractats *in vitro* amb 0,1 $\mu$ M de betametasona durant 48h. Analitzat per qRT-PCR. L'expressió gènica va ser normalitzada amb el gen *Gapdh*. Els resultats estan expressats com a mitjana + desviació estàndard del Log<sub>2</sub> del canvi de l'increment (FC) respecte a la condició de MC com a valor estàndard (test de Wilcoxon).



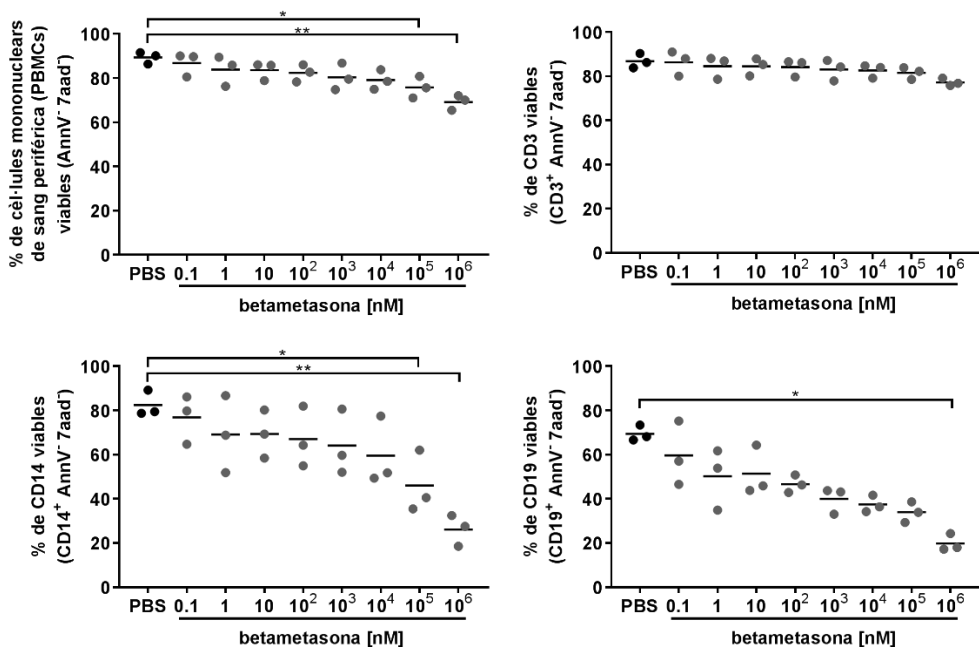
L'efecte protector de la betametasona no està mediat per cap d'aquestes dues molècules però el Btl9 podria ser rellevant en el control dels limfòcits T gd.

### 5.3 Aproximació indirecta dels efectes de la betametasona en humans

#### 5.3.1 La betametasona redueix la viabilitat de les cèl·lules mononuclears humanes de sang perifèrica

Per validar alguns dels resultats obtinguts en el model animal, es van aïllar PBMCs humanes per a valorar la viabilitat després de ser cultivades durant 48h amb betametasona.

Es va determinar la viabilitat de les PBMCs i de les poblacions de limfòcits T i B i monòcits. En les PBMCs es va observar una reducció significativa de la viabilitat a partir de la concentració de  $10^5$ nM de betametasona, encara que la tendència a disminuir s'observa a menor concentració (Figura 26). La concentració utilitzada supera varies vegades la necessària per induir un efecte similar en els esplenòcits de ratolins. En la població de limfòcits T ( $CD3^+$ ) no trobem una disminució estadísticament significativa ni amb la concentració més elevada del fàrmac. En canvi, en els limfòcits B ( $CD19^+$ ) si que es va observar una reducció estadísticament significativa amb la concentració més elevada. De forma similar a les PBMCs, els monòcits ( $CD14^+$ ) també s'observen afectats significativament per la betametasona a partir de la concentració de  $10^5$ nM



**Figura 26. La viabilitat de les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica humanes també es veu afectada per la betametasona.** Percentatge de viabilitat (Annexina V PE<sup>-</sup>, 7-aad<sup>-</sup>) de les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica humanes després de 48h en cultiu amb concentracions creixents de betametasona [0,1; 1; 10; 10<sup>2</sup>; 10<sup>3</sup>; 10<sup>4</sup>; 10<sup>5</sup> i 10<sup>6</sup> nM] (punts grisos) i amb PBS (punts negres). La línia representa la mitjana de n≥4 experiments independents (\*p≤0,05 i \*\*p<0,01, test de Dunn, test de Kruskal-Wallis)

En resum, l'efecte tòxic de la betametasona en cèl·lules del sistema immunitari humà només es va observar en els limfòcits B i monòcits i a altes concentracions, mentre que els limfòcits T madurs no es van veure afectats.

### 5.3.2 Avaluació epidemiològica preliminar de l'efecte de la betametasona prenatal en la incidència de DT1 a l'HUGTiP

Finalment es va optar per realitzar un estudi preliminar i prospectiu per determinar el possible efecte de la betametasona prenatal en la incidència de la DT1 en humans i validar els resultats obtinguts en el model animal de la malaltia. Per a l'estudi es van obtenir dades clíniques relacionades amb l'etapa perinatal dels pacients amb DT1 i dels seus germans com a subjectes control que van néixer entre els anys 2000 i 2017. A través del Servei de Pediatria de l'hospital Germans Trias i Pujol, es va realitzar una enquesta breu (annex 1) als pares i mares dels pacients per tal de conèixer la durada de la gestació, el pes al néixer i si la mare havia rebut betametasona durant l'embaràs. També, si algun dels fills havia desenvolupat DT1 i a quina edat.

**Taula 11. Resum de les enquestes a pacients de l'HUGTiP.** NA = no aplicable. Dades sobre la durada de la gestació, l'edat de diagnòstic i el pes presentades com a mitjana ± desviació estàndard (\*p≤0,05, test de Mann-Whitney). Dades sobre el tractament amb betametasona prenatal i parts prematurs presentades com a nombre de pacients tractats (percentatge respecte el total d'enquestes) (\*p≤0,05, test binomial).

Paràmetre	Pacients amb DT1	Controls
n	62	62
Durada gestació (setmanes)	39,87 ± 2,51	39,28 ± 2,06
Edat diagnòstic (anys)	8 ± 4,35	NA
Pes (kg)	3,30 ± 0,48*	3,09 ± 0,59
Betametasona prenatal	2 (3,23%)*	8 (12,90%)
Naixement prematur	4 (6,46%)	3 (4,84%)
Betametasona i prematur	2	3

El nombre total d'enquestes recollides va ser de 124. Es van recollir les dades d'un total de 62 pacients amb DT1 i 62 controls (Taula 11). Es va determinar la distribució

normal d'aquest grups utilitzant una regressió no lineal gaussiana. El grup control s'apropa més a la distribució normal ( $R^2=0,8575$ ) que el grup de pacients amb DT1 ( $R^2=0,7814$ ) el qual presenta una corba menys pronunciada a les 39 setmanes de gestació (Figura 27A). La durada de la gestació dels pacients i els controls no va mostrar diferències significatives entre els 2 grups ( $39,87 \pm 2,51$  setmanes en el grup de pacients amb DT1 i  $39,28 \pm 2,06$  setmanes en el grup control).

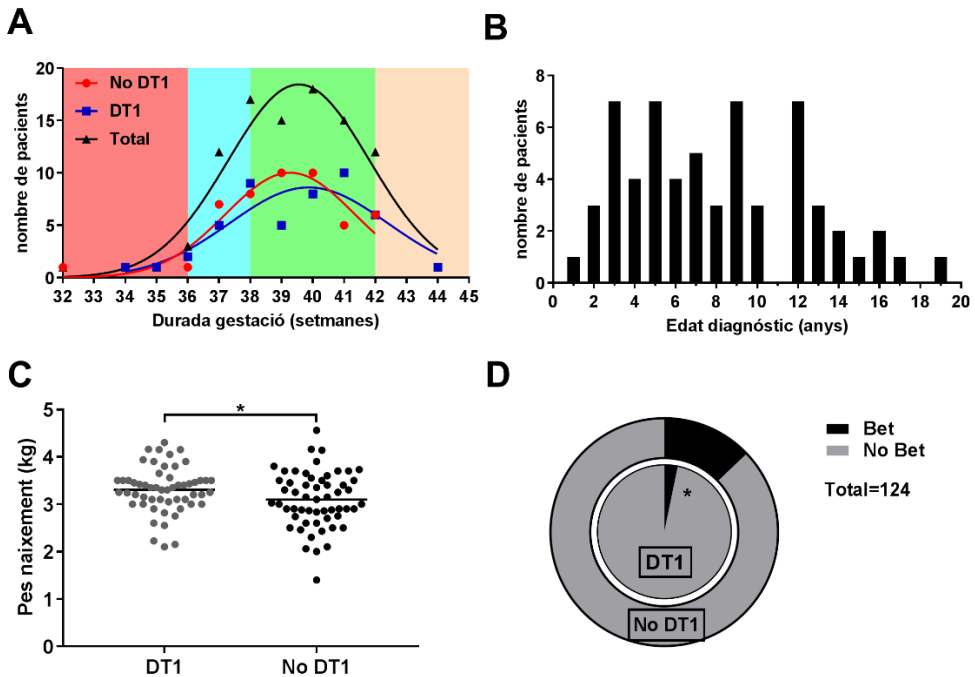
També es va determinar l'edat de diagnòstic dels pacients amb DT1 (Figura 27B), essent el rang entre els 1 anys i els 19 anys. L'edat mitjana de debut va ser  $8 \pm 4,35$  anys. Curiosament, no es va observar cap nen diagnosticat de DT1 als 11 anys.

Es va voler determinar la mitjana de pes al naixement en els dos grups. En el grup de pacient amb DT1 es va observar un pes mitjà de  $3,30 \pm 0,48$  kg ( $n=55$ ) mentre que el grup control el pes mitjà va ser de  $3,09 \pm 0,59$  kg ( $n=56$ ). Per tant, el grup de pacients amb DT1 presentaven un pes estadísticament superior al néixer respecte al grup control (Figura 27C)

Finalment es va voler determinar la utilització de betametasona prenatal en els pacients amb DT1 respecte als controls. Dins els pacients amb DT1 2 de 62 nens (3,23%) van rebre betametasona prenatal (Figura 27D, cercle interior). En els controls 8 de 62 nens (12,90%) van rebre betametasona prenatal (Figura 27D, cercle exterior). Per tal de comparar els dos grups es va realitzar un test binomial, es va utilitzar el grup control com a hipòtesis nul·la (resultats esperables) i es va comparar amb el grup de pacients amb DT1 (resultats observats) per veure si diferien respecte al grup control. Es va observar que el grup de pacients amb DT1 presentaven una diferència estadísticament significativa en el percentatge de nadons tractats prenatalment amb betametasona respecte al grup control (Figura 27D).

Generalment, la betametasona és un fàrmac que s'utilitza en mares que presenten un risc elevat de sofrir un part prematur (abans de les 37 SG). Es va determinar el nombre de pacients amb DT1 i de controls que van néixer prematurament, juntament amb si van ser tractats prenatalment amb betametasona. Es va observar 4 (6,46%) parts prematurs en els pacients amb DT1 i 3 (4,84%) parts prematurs en els controls. Dins el grup de pacients prematurs amb DT1 2 nens van ser tractats prenatalment amb betametasona mentre que 2 nens no van rebre betametasona. En els controls, tots els parts prematurs van ser tractats prenatalment amb betametasona.

En resum, els pacients amb DT1 tenien un pes superior al néixer que els controls i presenten un menor percentatge de tractament prenatal amb betametasona respecte el grup control. Sembla doncs, que la betametasona reduirà el risc de desenvolupar DT1 en aquesta mostra.



**Figura 27. Anàlisi dels factors perinatals en el desenvolupament de DT1 en humans.** **A)** distribució de les setmanes de gestació dels pacients amb DT1 (DT1, quadrat blau), dels controls (No DT1, cercle vermells) i de la suma dels 2 grups anteriors (Total, triangle negre). Les línies representen la regressió no lineal gaussiana de cada grup: DT1 (blau), No DT1 (vermell) i Total (negre). Aquestes línies representen la distribució normal de les dades. La zona ombrejada classifica els parts segons la setmana de gestació: preterme ( $\leq 36$  setmanes, vermell), a terme primerenc (37 setmanes, blau), a terme (38-42 setmanes, verd) i postterme ( $\geq 43$  setmanes, rosa). **B)** edat de diagnòstic dels pacients amb DT1 que van realitzar l'estudi ( $n=62$ ). **C)** Distribució del pes al naixement dels pacients amb DT1 (cercle gris,  $n=55$ ) i dels controls (cercle negre,  $n=56$ ) que van realitzar l'estudi. La línia representa la mitjana de 55-56 pacients independents ( $*p \leq 0,05$ , test de Mann-Whitney). **D)** Percentatge de pacients que van ser tractats prenatalment amb betametasona (negre) o no van ser tractats prenatalment amb betametasona (gris) abans del naixement. El cercle interior correspon als pacients amb DT1 i el cercle exterior correspon als pacients sense DT1. Es va realitzar un test binomial utilitzant els controls com a resultats esperables i els pacients amb DT1 com a resultats observats per valorar si els pacients amb DT1 presentaven un percentatge similar de betametasona prenatal que els controls ( $*p \leq 0,05$ , test binomial).



---

---

## *Discussió*

---

---



## 6. Discussió

Els factors ambientals són un factor de risc decisiu en el desenvolupament de la DT1. A més, en els últims anys, el nombre de factors de risc per la DT1 va en augment. Molts d'ells estan sent estudiat en grans estudis de cohorts que analitzen els hàbits de vida de nens des del naixement fins a l'edat adulta (Soltesz et al., 2007; Uusitalo et al., 2018; Ziegler et al., 2003). Altres són identificats per estudis epidemiològics (Kostic et al., 2015; Perrett et al., 2019) o directament al laboratori utilitzant models experimentals (García-Arévalo et al., 2016). Fins ara la gran majoria de factors ambientals s'havien relacionat directament amb l'etapa infantil, deixant de banda una fase de gran interès com és el desenvolupament fetal. De fet, l'addició dels factors prenatals encara complica més la comprensió de l'etiologia de la DT1. Ara bé, conèixer aquests factors pot ser clau per a la prevenció de la DT1 i de moltes altres malalties autoimmunitàries d'etiologia desconeguda. Per tant, cada cop més estudis se centren en l'etapa fetal (Greene et al., 2013; Sheen et al., 2016; Stene and Gale, 2013; Størdal et al., 2018) i en els efectes que poden produir-se en l'edat adulta a causa dels canvis i perturbacions soferts en aquest període. Un altre punt d'estudi se centra en com els fàrmacs administrats a la dona gestant poden afectar el fetus (Andrade et al., 2004; Oei, 2018).

Alguns factors com la dieta de la mare o infeccions víriques durant l'embaràs augmenten el risc de DT1 a la descendència (Craig et al., 2019). Aquest estudi es centra en els fàrmacs com a possible factor ambiental. Un dels fàrmacs sovint administrats durant l'etapa final de la gestació són els glucocorticoides sintètics, fàrmacs molt utilitzats per les seves propietats immunosupressores i antiinflamatòries. A més, les molècules d'aquesta família tenen un provat efecte sobre la maduració pulmonar en el fetus (Liggins and Howie, 1972), imitant l'increment de glucocorticoides que es produeix de forma natural unes setmanes abans del part i que permet el correcte desenvolupament de tots els òrgans. Evidentment, un increment sobtat de la concentració de glucocorticoides abans del necessari introduirà canvis en el fetus que podran influir en la incidència de malalties en edat adulta. Totes aquestes evidències suggereixen que els glucocorticoides, administrats prenatalment, podrien alterar el sistema immunitari i els òrgans diana de l'autoimmunitat i per tant la predisposició a desenvolupar una malaltia autoimmunitària. Però, pocs estudis han avaluat aquest possible risc en la salut del nadó. Valorar l'efecte dels fàrmacs administrats prenatalment en la susceptibilitat de desenvolupar una DT1 podria obrir noves portes a la investigació i ajudar a la prevenció de la malaltia. Un dels glucocorticoides més utilitzat en la etapa prenatal



com a estímul de maduració pulmonar és la betametasona. La utilització d'aquest fàrmac va molt lligada al nombre de parts prematurs. Per desgràcia, la tendència observada en els últims anys respecte als parts prematurs es que van en augment (Blencowe et al., 2012; Xu et al., 2015). Per tant, com a conseqüència la utilització de betametasona augmentarà al mateix ritme que els parts prematurs. Per aquest motiu, valorar els efectes de la betametasona com a factor ambiental pot ser de gran interès en el desenvolupament de la DT1.

En aquest estudi es determinen els efectes de la betametasona, un glucocorticoide sintètic utilitzat per la maduració dels pulmons del fetus, en la incidència i desenvolupament de la DT1, utilitzant un model murí que desenvolupa DT1 espontàniament. Els resultats van mostrar una disminució en la incidència de DT1 a causa de l'administració prenatal de betametasona. També es va observar una reducció en la infiltració de cèl·lules immunitàries a l'illot, així com canvis en el repertori de les cadenes  $V\beta$  del TCR i en les subpoblacions immunitàries després del naixement. També es va observar un efecte citotòxic contra els limfòcits T i B del ratolí adult. En canvi, en DCs, la betametasona va induir un estat de resistència a la maduració que va provocar una disminució en la secreció de citocines i en la capacitat d'estimular la proliferació de limfòcits T  $\gamma\delta$ . També es van determinar els efectes del fàrmac sobre la cèl·lula diana de la DT1, la cèl·lula  $\beta$  pancreàtica. Es va utilitzar la línia cel·lular NIT-1, sobre la que la betametasona va induir canvis en la capacitat de creixement, el fenotip, la secreció d'insulina i l'expressió gènica. Els canvis en la transcripció de determinats gens van ser similar en pàncrees i en illots del model experimental NOD. A més, es van determinar els possibles efectes de la betametasona en els leucòcits humans en els que també es va observar una reducció en la viabilitat. Finalment, en un intent de determinar l'efecte sobre el desenvolupament de DT1 en humans, es van realitzar enquestes a pacients amb DT1. Es va observar que el grup de pacients amb DT1 tenia un menor percentatge de nens tractats amb betametasona prenatal que el grup control. Per tant, la betametasona podria tenir un efecte protector sobre la DT1. Tot i això, calen més estudis sobre aquest fàrmac en humans per poder discernir l'efecte real en el desenvolupament de DT1.

Els glucocorticoides són fàrmacs immunosupressors i els seus efectes prenats reflectits a l'edat adulta són cada cop més coneguts (Diepenbruck et al., 2013; Seckl, 2004), tot i que els seus efectes en la DT1 són encara poc estudiats. En el cas de la betametasona, hi ha clares evidències del seu efecte en el sistema respiratori fetal (Liggins and Howie, 1972; Miracle et al., 2008), però els seus efectes secundaris han sigut poc valorats. Un estudi retrospectiu en una població danesa indica que l'administració de glucocorticoides sistèmics en l'etapa fetal augmenta el risc de desenvolupar una DT1 (Greene et al., 2013). En aquesta tesi s'ha observat un efecte oposat al que proposa Greene en el seu article. En el model experimental NOD la

betametasona administrada a mares gestants redueix clarament la incidència de DT1 en la descendència femella. Aquest resultat es pot explicar per les diferències entre espècies i grups d'estudi, ja que el model experimental NOD té una alta predisposició a desenvolupar un DT1. Presenta un sistema immunitari amb marcades diferències respecte al sistema immunitari humà (Mestas and Hughes, 2004), treballem amb unes condicions estandarditzades (estabulació lliure de patògens) i amb una població homogènia mentre que en humans no es poden controlar cap d'aquests dos últims factors. De fet, la comparació ideal amb el ratolí NOD serien dones tractades amb betametasona i amb descendència que presenti marcadors genètics d'alt risc de desenvolupar DT1, com podria ser HLA-DR3. A més, Greene et. al. no tenien en compte ni el tipus concret de glucocorticoide utilitzat de forma prenatal, ni la predisposició a desenvolupar una DT1 en la descendència, i per tant l'efecte observat en l'estudi pot ser degut a la betametasona o a altres glucocorticoides i no queda clar si afecta més a la població amb baix risc o a la població amb alt risc de desenvolupar DT1.

En aquest estudi es demostra que la betametasona prenatal disminueix la incidència de DT1 en la descendència femella, mentre que en mascles no s'observa una disminució en la incidència de DT1. Aquesta diferència entre mascles i femelles no s'explica pels nivells d'infiltració leucocitària dels illots, ja que la betametasona redueix la infiltració leucocitària en mascles i en femelles tractades prenatalment amb betametasona. Els mascles tendeixen a tenir menor infiltració leucocitària que les femelles tractades. Una possible explicació seria que l'infiltrat present en les femelles tingués un caràcter més regulador que en mascles i per això s'observés una disminució en la incidència de DT1 només en les femelles. D'altra banda, la utilització d'H&E no permet diferenciar entre els diferents tipus de cèl·lules del sistema immunitari infiltrants en el pàncrees. Tot i no poder valorar el tipus d'infiltrat leucocitari, sí que s'observa com la betametasona afecta el sistema immunitari independentment del sexe del ratolí. Aquest fet sobre el sistema immunitari queda evidenciat en la hipotròfia del timus observada en les cries 48 hores després del tractament amb betametasona. Aquesta disminució en el nombre de timòcits estarà causada per l'efecte tòxic de la betametasona contra els timòcits (Wyllie, 1980) i sobretot contra els limfòcits DP, que són la subpoblació més sensible a la apoptosi induïda pels glucocorticoides (Konkel et al., 2014). A més, la betametasona bloquejarà el pas de les CD8ISP cap a limfòcits DP, exacerbant més la depleció d'aquests limfòcits (Majumdar et al., 2017). D'aquesta manera, la betametasona estarà alterant el correcte desenvolupament dels limfòcits al timus i retardant la seva arribada als diferents òrgans limfoides (Zaharie et al., 2016). Tal i com s'observa clarament a d4 en la melsa de les cries de ratolí NOD, on el nombre de limfòcits T és menor en el grup tractat que en el grup control. A més, la reducció en la subpoblació de LTIs dificultarà la formació d'òrgans limfoides terciaris en el

pàncrees (Kendall et al., 2007; van de Pavert and Mebius, 2010). Un altre efecte descrit dels glucocorticoides és que indueixen canvis en l'hematopoesi afavorint la generació de llinatge mieloide (Solano et al., 2016), fet que concorda amb la disminució de limfòcits B observada a d1 en la melsa. A més, les subpoblacions mieloides també es veuen afectades per la betametasona prenatal: L'efecte més evident és l'observat en neutròfils, ja que la betametasona provoca un gran increment d'aquestes cèl·lules a d1 perquè evita que s'adhereixin a la paret dels vasos sanguinis (Fay et al., 2016; Weber, 2003), fet que dificulta l'extravasació dels neutròfils. Això podria ser un mecanisme de protecció contra la DT1, ja que els neutròfils estan implicats en l'atac inicial contra la cèl·lula  $\beta$  i ajuden a organitzar la resposta dels limfòcits T (Diana et al., 2013). Una altra cèl·lula implicada en la destrucció inicial són els macròfags (Carrero et al., 2017). Aquestes cèl·lules són importants per al correcte desenvolupament del pàncrees (Van Gassen et al., 2015), a part de ser les primeres cèl·lules del sistema immunitari innat presents en el pàncrees. Tot i que en aquest estudi no s'ha pogut analitzar aquesta població cel·lular, altres estudis demostren que la dexametasona prenatal pot induir el canvi fenotípic dels macròfags cap a M2 (Teixeira et al., 2019), fenotip que es caracteritza per la baixa producció de citocines proinflamàtores com l'IL-1 $\beta$ , el TNF- $\alpha$  i l'IL-6 (Mantovani et al., 2004). Al pàncrees, aquests macròfags promouen la proliferació cel·lular i la inhibició de l'apoptosi (Teixeira et al., 2019) reduint el risc d'inici de l'atac autoimmunitari. En aquest context, la betametasona podria estar exercint un efecte similar a la dexametasona sobre els macròfags induint la transició a l'estadi tolerogènic M2. En resum, aquestes dades recolzen l'efecte agut de la betametasona sobre el sistema immunitari en la fase prenatal i com pot afectar en la incidència de la DT1.

Tanmateix, un altre punt important en el desenvolupament de la DT1 és que els limfòcits T autoreactius tinguin l'afinitat suficient per a reconèixer i ser estimulats per antígens propis. En el model NOD es coneixen les famílies de V $\beta$  dins el TCR que reaccionen als autoantígens de la DT1. Els limfòcits T infiltrants del pàncrees de ratolins NOD tenen un repertori esbiaixat a un nombre limitat de V $\beta$ , que inclouen la V $\beta$ 2, V $\beta$ 4, V $\beta$ 6, V $\beta$ 8.1 i V $\beta$ 12 (Diz et al., 2012; Marrero et al., 2013, 2016; Quinn et al., 2006; Sarukhanu et al., 1994; Toivonen et al., 2015). Els resultats d'aquesta tesi demostren que la betametasona distorsiona la correcta maduració limfocitària al timus, provocant que al cap de 6 setmanes trobem algunes d'aquestes V $\beta$  menys representades en la melsa dels ratolins que van ser tractats prenatalment amb betametasona. Aquesta reducció en les V $\beta$  que més influencien el desenvolupament de la DT1, però no la seva total eliminació, podria explicar la reducció en la incidència i perquè no arribem a la prevenció total de la malaltia. Per exemple, es va trobar un menor percentatge de limfòcits T amb la V $\beta$ 4 en els ratolins tractats prenatalment amb betametasona respecte als controls. Aquesta família V $\beta$  reconeix

un dels epítops dominants de GAD65 i s'ha observat, en les melses de ratolins prediabètics, una resposta de limfòcits T contra aquest antigen (Quinn et al., 2006). Per tant, aquest epítop és important en la resposta primària contra l'illot pancreàtic. En el model NOD la resposta antigènica està restringida a un nombre limitat de clonotips (Marrero et al., 2016; Toivonen et al., 2015), així que canvis subtils en la composició del repertori TCR, si afecta a les famílies V $\beta$  específics de la malaltia, podrien influenciar el desenvolupament de la DT1. Aquestes dades indiquen que la reducció de la incidència de DT1 en el model experimental podria ser per l'efecte de la betametasona prenatal sobre el sistema immunitari, ja que hem observat tant canvis just després del naixement, com canvis al cap de 25 setmanes en diferents aspectes del sistema immunitari que influeixen en el desenvolupament de la DT1.

Tot i que els experiments *in vivo* donen una gran quantitat d'informació és més complicat observar els efectes específics de la betametasona contra les diverses cèl·lules del sistema immunitari. La betametasona pot afectar de manera diferent depenent del tipus cel·lular amb que estigui reaccionant, ja que l'expressió del RG pot varia depenent de teixit o del cycle cel·lular (Oakley and Cidlowski, 2011b) i de diferents processos de "splicing" en el exó 1 del mRNA (Turner et al., 2006). Per tal d'aprofundir més en els efectes de la betametasona es van realitzar estudis *in vitro* amb diferents tipus cel·lular aïllats, tant del sistema immunitari com les cèl·lules diana de l'atac autoimmunitari en la DT1, per determinar l'efecte específic del fàrmac. Com ja s'ha mencionat en aquesta tesi, els timòcits i limfòcits s'observen alterats per efecte de la betametasona en les cries. Aquest efecte es reproduïx perfectament en cultius *in vitro* d'esplenòcits provinents del ratolí NOD, on també veiem un efecte tòxic del fàrmac sobre aquestes cèl·lules utilitzant una concentració baixa de betametasona. En altres models experimentals ja s'havia observat un efecte similar en la viabilitat dels timòcits *in vitro* utilitzant una concentració similar de betametasona (Diepenbruck et al., 2013). De forma similar, en una línia cel·lular de limfoblasts sensibles als glucocorticoides s'observa el mateix efecte tòxic de la betametasona i d'altres glucocorticoides a una concentració similar a la utilitzada en aquesta tesi (Longui et al., 2005). Així que els limfòcits T de ratolí són sensibles a la mort cel·lular induïda pels glucocorticoides. En canvi, en PBMCs humanes, tot i que la betametasona també demostra un efecte tòxic sobre aquestes cèl·lules, la concentració necessària és més elevada que en el ratolí, necessitem 10000 vegades més concentració de betametasona per a observar una disminució estadísticament significativa. En la mateixa línia, dosis elevades de betametasona (de l'ordre de  $\mu$ M) afecten la viabilitat de línies cel·lulars humanes de queratinòcits (Guichard et al., 2015). Per tant, en general, les cèl·lules humanes de l'adult són menys susceptibles a la mort cel·lular induïda pels glucocorticoides, de manera que una dosi puntual de glucocorticoides no arribarà a causar un efecte tòxic sobre el sistema immunitari madur en humans.

Per seguir aprofundint en l'efecte de la betametasona sobre els limfòcits es va realitzar un cultiu en presència de mitògens per valorar l'efecte sobre la divisió cel·lular. En aquest cas, la viabilitat utilitzant la mateixa concentració de betametasona va ser molt superior en els grups estimulats amb mitògens. Per tant, l'estímul de proliferació que aporta el mitogen contraresta l'efecte de la betametasona en les cèl·lules del sistema immunitari del ratolí, així que possiblement l'efecte tòxic de la betametasona està lligat a la proliferació cel·lular. La betametasona té la capacitat d'induir una aturada del cicle cel·lular en la fase G1/G0, reduint el nombre de cèl·lules que arriben a fase S (Guichard et al., 2015; Jin et al., 2015b). Sembla doncs, que l'estímul del mitogen decantarà la balança metabòlica cap a la proliferació i la supervivència. Els limfòcits, al poder continuar el cicle cel·lular, no entraran en processos de mort cel·lular associats a aquest bloqueig. S'ha vist que la betametasona a altes concentracions té la capacitat d'aturar la proliferació dels limfòcits T en humans (Hirano et al., 1998). Així que la dosi utilitzada en el ratolí és insuficient per evitar la proliferació dels limfòcits que han sigut estimulats i per això la viabilitat d'aquestes cèl·lules augmenta. La potència de l'estímul inhibeix la capacitat d'aturar la proliferació de la betametasona, això queda present en els limfòcits B, on la seva viabilitat sí que es veu afectada amb la concentració més elevada de betametasona, possiblement perquè l'estímul de PMA+IO és menys específic per a aquestes cèl·lules o perquè són una població més sensible als efectes de la betametasona. En definitiva, la betametasona atura el cicle cel·lular dels limfòcits i això provocarà la mort cel·lular degut a la falta d'estímuls de supervivència.

Tot i que els limfòcits són importants en el desenvolupament de la DT1, les CPA fan un paper crucial en l'inici de l'atac autoimmunitari. Per aquest motiu es va determinar l'efecte de la betametasona en la generació de cèl·lules dendrítiques. Altres glucocorticoides, com la dexametasona, tenen la capacitat d'alterar la generació de DCs i transformar-les en DCs tolerogèniques (Lee et al., 2017; Naranjo-Gómez et al., 2011; Qiu et al., 2006; Zhao et al., 2018). Es va voler verificar que la betametasona induïa el mateix efecte que la dexametasona sobre les DCs. Primerament es va valorar l'expressió de molècules de membrana en les DCs estimulades amb betametasona durant la seva diferenciació des de precursors de moll d'os després d'induir la seva maduració amb LPS. Aquestes cèl·lules van presentar un perfil similar a les DCs generades amb dexametasona (García-González et al., 2013), es va observar una baixada de l'expressió de CD86, CD40 i MHC classe II. Aquest fenotip també s'observa en DCs tolerogèniques induïdes amb altres estímuls (Navarro-Barriuso et al., 2018; Pujol-Autonell et al., 2015). A més, tant l'expressió de MHC classe I com de CD25 van ser més elevades en les condicions amb una concentració elevada de betametasona. El CD25 en DCs està relacionat amb l'estat de maduració, activació (Menges et al., 2002) i es considera un marcador

de tolerogènia en les DCs (Driesen et al., 2008). Aquest increment en l'expressió de MHC classe I i CD25, juntament amb la disminució de les molècules de coestimulació farà que les DCs presentin majoritàriament als limfòcits T CD8, però no induiran la seva expansió clonal. Aquestes DCs tindran capacitat per a presentar antígens, però no per a iniciar un atac autoimmunitari, sinó que induiran un estat d'anergia en els limfòcits T CD8 autoreactius degut a aquesta falta d'estimulació de la molècula CD28 i a la reducció d'interleucina-2 (IL-2) disponible en el medi (Chappert and Schwartz, 2010). Quant s'utilitza com a estímul de maduració il·les CpG, s'observa una disminució en l'expressió de MHC classe I, aquesta disminució seria equivalent a la produïda en l'expressió de MHC classe II amb la maduració per LPS, ja que les il·les CpG estimulen la maduració a través del TLR9 que detecta la presència de DNA microbià intracel·lular (Ashkar and Rosenthal, 2002). Per tant promou l'expressió de MHC classe I per a presentar l'antigen als limfòcits T CD8 i induir una resposta contra patògens intracel·lulars. L'expressió de les altres molècules és molt similar entre iDCs, mDCs i betDCs possiblement per falta de concentració en l'estímul de maduració utilitzat en aquest estudi, ja que està demostrat que les il·les CpG també estimulen l'expressió de CD40 CD80 i MHC classe II en les DCs (Behboudi et al., 2000). Possiblement, una estimulació més eficient de les mDCs amb il·les CpG replicaria els resultats obtinguts utilitzant LPS com a estímul de maduració. Encara que no veiem canvis tan dràstics com els induïts amb la maduració de les DCs amb LPS, la betametasona també afecta la maduració amb il·les CpG. Per tant, la betametasona evita la total maduració de les DCs independentment de l'estímul utilitzat.

Les citocines són un element clau en la funcionalitat de les DCs. Per aquest motiu es va valorar la capacitat de secreció de citocines d'aquestes DCs. Ja que l'expressió de diferents citocines poden dirigir la resposta dels limfòcits T contra un antigen. Les iDCs produeixen de forma basal diferents tipus de citocines pro i antiinflamatòries, aquesta producció de citocines pot augmentar quan les iDCs reben un estímul de maduració com el LPS. Citocines com la IL-6, el TNF $\alpha$  (Morelli et al., 2001) i la IL-10 (Fujita et al., 2006) estan regulades per aquest estímul, mentre que el TGF $\beta$  no es veu afectada per la maduració de les DCs induïda pel LPS. Tant IL-6 com TNF $\alpha$  són citocines proinflamatòries molt importants en la generació de respostes autoimmunitàries (Blanco et al., 2008; Kimura and Kishimoto, 2010). A més, la IL-6 i el TNF $\alpha$  promouen la secreció d'IL-17 per part dels limfòcits Th17 en artritis reumatoide (Zheng et al., 2014). En canvi, IL-10 i TGF $\beta$  són citocines antiinflamatòries que poden actuar de forma autocrina, com la IL-10, per aturar la maduració de les DCs (Corinti et al., 2001) o directament induint limfòcits T reguladors en el cas del TGF $\beta$  (Esebanmen and Langridge, 2017; Peng et al., 2004). L'efecte del LPS en la inducció de la secreció de citocines s'observa perfectament en els resultats obtinguts en aquesta tesi, on veiem l'increment en la secreció d'IL-6,

TNF $\alpha$  i IL-10 en la condició de mDCs, mentre que la concentració de TGF $\beta$  és similar entre iDCs i mDCs. Això provoca un marcat canvi en el perfil de secreció quan comparem les iDCs amb les mDCs. En les iDCs predomina la secreció de TGF $\beta$ , mentre que en les mDCs predomina la secreció d'IL-6, conferint una major capacitat d'estimular la proliferació dels limfòcits T autoreactius. En les betDCs el perfil de citocines és més similar a les mDCs que a les iDCs, ja que segueix predominant la secreció d'IL-6, però es va observar una reducció en la secreció d'IL-6, TNF $\alpha$  i IL-10 respecte a les mDCs. Sembla doncs, que la betametasona bloqueja la capacitat d'estimular la secreció de citocines del LPS en DCs, evitant la completa maduració d'aquestes cèl·lules, juntament amb la reducció observada en l'expressió de CD40 i CD86 recolza un estat semi-madur de les DCs que induiria l'anergia dels possibles limfòcits T autoreactius (Jonuleit et al., 2001).

Per tal de comprovar que les betDCs tenen un fenotip semi-madur es van realitzar experiments funcionals per valorar la seva capacitat d'induir una proliferació clonal contra la insulina en limfòcits de ratolí NOD. Tal com s'esperava no es van observar diferències en la proliferació dels limfòcits B entre les 5 condicions. Tot i que si trobem una proliferació basal d'aquesta població possiblement induïda per l'alliberament de citocines per part de les DCs en el medi. En canvi, en els limfòcits T si que s'esperava observar un increment de la proliferació de les subpoblacions CD4 i CD8 (Marin-Gallen et al., 2010; Pujol-Autonell et al., 2015). Sorprenentment, no es van observar diferències entre la capacitat d'induir proliferació de les iDCs, de les mDCs i de les betDCs en aquestes subpoblacions limfocitàries. Malgrat això, les mDCs indueixen la proliferació dels limfòcits T  $\gamma\delta$  mentre que les iDCs i betDCs no. A més, s'observa una clara disminució de la concentració d'IL-17, citocina produïda pels limfòcits T  $\gamma\delta$ , en les condicions de betDCs respecte a les mDCs. Els limfòcits T  $\gamma\delta$  són una població minoritària entre les cèl·lules del sistema immunitari, en ratolí aquests limfòcits representen entre un 1-2% del total de leucòcits en melsa (Funda et al., 1995). Tot i això en DT1 tenen un paper important en l'inici de l'atac autoimmunitari ja que potencien l'atac dels limfòcits T contra les cèl·lules  $\beta$  mitjançant la producció d'IL-17 sense l'ajuda d'una CPA per començar a produir aquesta citocina proinflamatòries (Markle et al., 2013). A més el ratolí NOD té una major predisposició a la producció d'aquest tipus cel·lular en comparació a altres soques (Feng et al., 2011). La proliferació observada induïda per les mDCs es tradueix en un augment del percentatge dels limfòcits T  $\gamma\delta$  i en un augment en la secreció d'IL-17. Aquest percentatge és 3 vegades superior al percentatge observat en les iDCs i les betDCs. Així que, les mDCs estan induint una proliferació específica d'aquesta població, mentre que les betDCs, que presenten un perfil semi madur, inhibeixen aquesta proliferació i la secreció d'IL-17. A més, reduir el nombre de limfòcits T  $\gamma\delta$  evitarà processos de retroalimentació amb les DCs (Casetti and Martino, 2008) inhibint la creació d'una resposta autoimmunitària i per tant reduint

la incidència de DT1 en el ratolí NOD. Tanmateix hi ha un estudi que postula sobre el rol protector dels limfòcits T  $\gamma\delta$  en el ratolí NOD (Han et al., 2010), però els resultats obtinguts en aquesta tesi recolzen el rol patogènic dels limfòcits T  $\gamma\delta$ , ja que la betametasona redueix la incidència de DT1 en el model murí i les betDCs inhibeixen la proliferació dels limfòcits T  $\gamma\delta$  i la secreció d'IL-17 i altres citocines proinflamatòries que indueixen l'inici de la DT1 en el model experimental.

Aquest impediment en l'inici de la resposta autoimmunitària a causa dels dèficits de maduració de les DCs i la menor capacitat d'extravasació dels neutròfils al pàncrees observada al naixement, juntament amb la menor disponibilitat de limfòcits T amb TCR autoreactius contra els antígens de la cèl·lula  $\beta$ , podrien explicar la reducció de la incidència observada directament en el model experimental després del tractament prenatal amb betametasona.

Queda clar que la betametasona prenatal té la capacitat d'influenciar en el sistema immunitari del model experimental. En la DT1, no només és important el sistema immunitari, sinó que la cèl·lula diana té un rol actiu en la seva pròpia destrucció (Atkinson et al., 2011; Soleimanpour et al., 2014), en la seva protecció (Colli et al., 2018) o en la seva regeneració (Meier et al., 2005). Canvis funcionals i fenotípics en les cèl·lules  $\beta$  productores d'insulina poden ser crucials en la pèrdua de la tolerància als antígens propis. De forma similar al que s'observa en el sistema immunitari, la betametasona prenatal podria afectar a la cèl·lula  $\beta$  a causa de la seva inespecificitat d'acció. La principal limitació per a estudiar els efectes de la betametasona sobre les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques va ser l'obtenció de cèl·lules  $\beta$ . Per aquest motiu, tot i saber les diferències entre cèl·lules  $\beta$  primàries i línies cel·lulars es va utilitzar la línia cel·lular NIT-1 que prové d'un insulinoma de ratolí NOD (Hamaguchi et al., 1991) i per tant manté una expressió de proteïnes similar a la del NOD.

Es va determinar la toxicitat directa de la betametasona sobre aquesta línia cel·lular. De forma similar als resultats obtinguts amb els limfòcits de ratolí es va observar una disminució de la viabilitat d'aquestes cèl·lules després d'una dosi puntual de betametasona, com ja ha sigut descrit en altres línies cel·lulars que tenen un origen tumorigènic (Guichard et al., 2015; Jin et al., 2015b). Quant aquestes cèl·lules es van mantenir en presència de betametasona de forma continuada durant 8 dies, el creixement exponencial normal de la línia cel·lular va quedar inhibit. Això confirma la capacitat de la betametasona d'aturar el cicle cel·lular evitant la duplicació de les cèl·lules (Guichard et al., 2015). La viabilitat durant els 8 dies de cultiu amb betametasona va ser similar a la viabilitat del cultiu control, per tant la reducció en la proliferació no va ser degut a la inducció de l'apoptosi de les cèl·lules NIT-1, de forma similar al que s'observa en cèl·lules del cervell tractades amb betametasona prenatal (Scheepens et al., 2003). Un cop eliminada la betametasona del cultiu, la recuperació de la proliferació no va ser immediata i no es va observar l'entrada a la



fase de creixement exponencial fins a dues setmanes després. Aquesta duració observada concorda perfectament al efecte descrit en humans, on l'efecte protector de la betametasona prenatal en el fetus es de dues setmanes i passat aquest temps el risc de síndrome de dificultat respiratòria aguda augmenta considerablement (Ring et al., 2007). Es probable doncs, que la senyalització de la betametasona es mantingui fins a 2 setmanes o que les proteïnes induïdes per el receptor durin aquest temps.

Una única dosi de betametasona va ser suficient per a reduir la capacitat de secreció de pèptid C en les cèl·lules NIT-1, augmentar els nivells en membrana de MHC classe I i reprimir l'expressió en membrana de la proteïna CD44. La disminució en la secreció de pèptid C és una mesura indirecta de la secreció d'insulina. Els glucocorticoides com la dexametasona inhibeixen de forma reversible la secreció d'insulina sense alterar la síntesis proteica (Lambillotte et al., 1997). Sembla que la betametasona té un efecte similar a la dexametasona, ja que no s'observa una disminució en l'expressió del gen *Ins2* en la línia cel·lular després del tractament amb betametasona. Encara que no tenim evidències directes de la recuperació de la secreció d'insulina, es possible que recuperi els nivells normals com s'ha observat en la capacitat de proliferació d'aquestes cèl·lules. Sorprenentment, l'efecte de la betametasona sobre l'expressió de MHC classe I és el mateix que l'observat en les betDCs. Aquest increment podria amplificar la presentació d'antígens endògens però juntament amb la reducció de l'expressió de CD44 suggereix un mecanisme d'evasió immunològica. El CD44 va ser estudiat per la seva funció en la regulació de l'adhesió cel·lular i la migració, tant en la infiltració limfocitària (Savinov and Strongin, 2007) com en el desenvolupament de la DT1 experimental (Weiss et al., 2000). A més, el tractament amb anti-CD44 millora la producció d'insulina en illots pancreàtics trasplantats perquè redueix el nombre de limfòcits T que infiltraran l'illot pancreàtic (Peng et al., 2011). En humans, aquesta molècula es troba sobre-expressada en pacients amb DT1, sobretot a l'inici clínic de la malaltia (Planas et al., 2010). Per tant, la sobre-expressió de CD44 pot incrementar la susceptibilitat a la destrucció immune de les cèl·lules  $\beta$  (Assayag-Asherie et al., 2015) i la disminució contribuirà a la protecció de la cèl·lula  $\beta$  en el context de la autoimmunitat. Aquesta disminució en l'expressió del gen *Cd44* també es va observar en la línia cel·lular confirmant l'efecte en l'expressió de membrana d'aquesta proteïna. Aquesta disminució dificultarà la correcta formació de la sinapsis immunològica, ja que el CD44 està implicat en la formació de l'anell exterior d'aquest mecanisme de contacte entre les cèl·lules del sistema immunitari i les cèl·lules del teixit (Hegde et al., 2008). En el cas dels limfòcits T CD8 la formació d'aquesta unió es indispensable per a poder realitzar el seu efecte citotòxic de manera eficient i dirigida (Stinchcombe et al., 2001), per tant, la reducció de l'expressió d'aquesta molècula en la superfície de la cèl·lula  $\beta$  pot dificultar l'efecte citotòxic dels limfòcits T CD8

autoreactius. Aquesta disminució del *Cd44* també s'observa en els pàncrees de les cries de ratolí NOD, però no en illots provinents de ratolins NOD no diabètics on podria ser que les cèl·lules infiltrants del sistema immunitari emmascarin l'efecte de la betametasona sobre aquest gen.

Els canvis fenotípics i funcionals induïts per la betametasona en la cèl·lula diana de la DT1 van estar acompanyats per canvis en l'expressió de gens relacionats amb els autoantígens, l'autoimmunitat, el metabolisme i la massa de cèl·lula  $\beta$  a l'illot. Aquests canvis demostren la capacitat de la betametasona d'alterar processos intrínsecs del metabolisme de la cèl·lula  $\beta$ , per exemple la repressió del gen *Igf1r* i la sobre-expressió del gen *Ptprj* que indiquen com la betametasona pot alterar la sensibilitat a la insulina (Krüger et al., 2015), incrementant la resistència contra aquesta hormona com ja està descrit utilitzant altres glucocorticoides com la dexametasona (Sheen et al., 2016). Sobretot, la repressió en el gen *Igf1r* pot influir en el desenvolupament embrionari (Liu et al., 1993). Alhora, la sobre-expressió del gen *Pten* explicaria la inhibició del creixement cel·lular *in vitro* observada en la línia cel·lular NIT-1 (Stiles et al., 2006). Per altra banda, trobem una sobre-expressió del gen *Cd14*, un receptor de reconeixement de patrons, que podria ser a causa d'un mecanisme homeostàtic de regulació de la secreció d'insulina induïda per un estrès cel·lular (Vives-Pi et al., 2003). Tot i això, no es va observar cap efecte en les cèl·lules NIT-1 per l'absència del lligand d'aquest receptor (LPS) en el medi de cultiu. La betametasona també podria afectar la massa de cèl·lula  $\beta$  degut a la sobre-expressió del gen *Il22ra1*, receptor que indueix la expressió dels gens Regenerating (*Reg*) després de l'estimulació amb interleucina-22 (Hill et al., 2013). De nou, l'absència del lligand en les condicions de cultiu va prevenir l'efecte en la línia cel·lular.

Curiosament, en els illots tractats es va observar una sobre-expressió del gen *Ki67*, marcador de proliferació cel·lular que s'expressa quan la cèl·lula abandona la fase G0 del cicle cel·lular (Scholzen and Gerdes, 2000). Tot i ser sorprenent, altres estudis arriben a resultats similar en la proliferació de la cèl·lula  $\beta$  després de la utilització puntual de glucocorticoides (Protzek et al., 2014) o potenciant la concentració de glucocorticoides endògens (Liu et al., 2014). Sembla doncs, que la betametasona només afectaria la proliferació cel·lular quan tenim una proliferació exagerada com en el cas de línies tumorals immortalitzades (Guichard et al., 2015; Jin et al., 2015b) o en dermatitis atòpica i psoriasis (Jensen et al., 2009; Vissers et al., 2004).

L'expressió del gen *Ccl2* també es veu modificada per la betametasona en el teixit diana de la DT1. Aquesta quimiocina intervé en el reclutament de monòcits, macròfags, DCs i limfòcits T activats al pàncrees provocant la destrucció de l'illot (Martin et al., 2008) o la protecció d'aquest (Kriegel et al., 2012). L'expressió d'aquest gen es va observar reprimida en els illots tractats amb betametasona i en els pàncrees de les cries de ratolí NOD que havien rebut betametasona prenatal.

Això correlaciona amb la disminució de la infiltració pancreàtica destructiva. Per altra banda, el gen *Ccl2* en les cèl·lules NIT-1 està sobre-expressat, però això podria ser per el origen tumoral de la línia cel·lular. Una altra quimiocina important en la DT1 és la *Cxcl2*. El gen que codifica aquesta proteïna es va observar sobre-expressat en les cèl·lules NIT-1, en els pàncrees i en els illots pancreàtics. Aquesta quimiocina senyalitza principalment l'arribada de neutròfils al teixit diana, aquestes cèl·lules tenen un rol important en la destrucció de la cèl·lula  $\beta$  en presència de limfòcits T (Diana and Lehuen, 2014). Tanmateix, l'arribada de limfòcits T al teixit diana es veu afectada per la repressió del gen *Ccl2* i per la reducció en el nombre total de limfòcits T circulants després del tractament amb betametasona. En aquest cas els neutròfils que arribin al pàncrees podran eliminar els cossos apoptòtics sense generar una resposta immunitària contra la cèl·lula  $\beta$  i per tant contribuirà a reduir la inflamació del teixit (Esmann et al., 2010). Aquest podria ser un dels motius pels quals veiem una infiltració leucocitària menor en els ratolins tractats amb betametasona a edat adulta i de l'augment de neutròfils en les cries de ratolí NOD.

Pel que fa als autoantígens, el gen *Gad1*, que genera l'autoantigen GAD67 (Choi et al., 2002), es va observar altament sobre-expressat per el tractament amb betametasona. Els glucocorticoides indueixen la sobre-expressió d'aquest gen (Kim et al., 2002). L'altra isoforma, codificada pel gen *Gad2*, el GAD65 és un dels autoantígens claus en l'inici de l'atac autoimmunitari en el ratolí NOD (Kash et al., 1999). La betametasona no indueix canvis en l'expressió d'aquest gen. A diferència del GAD65, el GAD67 no té un rol definit en l'inici de l'atac autoimmunitari contra les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques. A més, s'ha demostrat que la immunització amb aquesta proteïna protegeix en front de la DT1 en el model experimental NOD (Elliott et al., 1994). Justament una de les famílies V $\beta$  més afectades per la betametasona és la que reconeix el GAD65. Els efectes protectors de la sobre-expressió en el gen *Gad1* estaran reforçats per la disminució del reconeixement de l'autoantigen més agressiu contra les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques.

Un altre punt important és la susceptibilitat a la apoptosi de les cèl·lules  $\beta$ . Un dels gens identificats en aquest procés són el *Glis3* i *Manf*, la repressió d'aquests gens provocarà problemes en el plegament de proteïnes i crearà noves proteïnes propoètiques (Lindahl et al., 2014; Nogueira et al., 2013). A més, *Glis3* és important en el desenvolupament dels illots pancreàtics en l'etapa neonatal i controla l'expressió gènica de l'insulina (Wen and Yang, 2017). En el cas del ratolí NOD, aquest gen es troba reprimat respecte a altres soques. Això provoca que el ratolí NOD presenti una major susceptibilitat a la apoptosi de la cèl·lula  $\beta$  i per tant major possibilitat de desenvolupar una DT1 (Dooley et al., 2016). Per tant, un increment en l'expressió de *Glis3* i *Manf* reduiran la susceptibilitat a la apoptosi de les cèl·lules  $\beta$  en els illots de les cries de ratolí NOD tractades prenatalment amb betametasona. Això reduirà el nombre d'autoantígens alliberats al medi i protegirà les cèl·lules  $\beta$  de

la apoptosi induïda per citocines proinflamatòries. A més, un altre efecte beneficiós d'aquesta sobre-expressió del Glis3 és que ajudarà a la diferenciació des dels precursors pancreàtics fins a cèl·lula  $\beta$  per la transactivació del gen *Ngn3* (Shih et al., 2013; Wen and Yang, 2017).

Per finalitzar amb els estudis de les alteracions en el transcriptoma de la cèl·lula  $\beta$  induïts per la betametasona es va voler determinar l'efecte sobre l'expressió de molècules immunomoduladores com *Pdl1*, *Btnl2* i *Btnl9*. Esta descrit que una sobre-expressió de *Pdl1* en les cèl·lules  $\beta$  té un efecte protector ja que evita l'activació dels limfòcits T autoreactius a l'illot (Wang et al., 2008). Sorprenentment, es va observar una repressió del gen *Pdl1* a causa del tractament amb betametasona. S'ha observat que PDL1 està sobre-expressat en illots com a resposta a l'atac autoimmunitari i a la inflamació (Colli et al., 2018). Per tant, la betametasona al bloquejar les senyals proinflamatòries podria estar bloquejant l'expressió del gen *Pdl1* en les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques. Els gens *Btnl* són una família de gens que transcriuen molècules amb capacitat d'atenuar de processos inflamatoris associats a teixit (Abeler-Dörner et al., 2012), també estan relacionades amb el control de les poblacions de limfòcits T  $\gamma\delta$  en l'intestí (Melandri et al., 2018). A més, el BTNL2 fa una funció similar a PDL1, ja que inhibeix l'activació dels limfòcits T (Nguyen et al., 2006) i pot prevenir la DT1 experimental (Tian et al., 2019). En aquest gen es va observar el mateix efecte de repressió de l'expressió gènica que en el gen *Pdl1* i per tant la betametasona estaria induint un efecte similar. Per altra banda, es va trobar que el gen *Btnl9* estava sobre-expressat després del tractament amb betametasona. La funció d'aquest gen no esta definida i seria necessari ampliar estudis sobre la funcionalitat d'aquesta molècula. Tot i això, sabem que *Btnl9* és ortòleg al gen humà *BTNL9* (Abeler-Dörner et al., 2012) i per això és possible que les seves funcions siguin similars. En humans s'ha observat que l'expressió d'aquest gen redueix la capacitat de metastasis del melanoma uveal (Jiang and Liu, 2019), però el mecanisme d'acció segueix sent desconegut.

En resum, la betametasona té efectes directes sobre la cèl·lula  $\beta$  pancreàtica influint tant amb el seu metabolisme com amb la interacció enfront del sistema immunitari. Aquests efectes protegirien la cèl·lula  $\beta$  en 2 aspectes claus: Primer, la possible reducció de la susceptibilitat a l'apoptosi, la menor quantitat d'autoantígens alliberats i el reclutament del sistema immunitari innat però no del sistema immunitari adaptatiu dificultaran l'activació de limfòcits autoreactius. Segon, la reducció en molècules d'adhesió possiblement dificultarà el reconeixement d'aquestes cèl·lules  $\beta$  per part dels limfòcits T activats. Tot i això sembla que la betametasona té un efecte perjudicial en la proliferació de les cèl·lules  $\beta$ , però només de forma puntual. Això podria ser beneficiós, ja que estem reduint la possibilitat que s'alliberin més autoantígens degut a l'increment de la massa  $\beta$ .

Per validar els resultats dels efectes de la betametasona en la incidència de DT1 en el model experimental es va realitzar un estudi epidemiològic preliminar dels pacients pediàtrics amb DT1 de l'HUGTiP. Aquest estudi va consistir en una enquesta per recollir dades sobre la fase perinatal com la durada de la gestació, el pes al naixement i la utilització de betametasona durant la gestació. Aquest estudi presenta dues clares limitacions. La primera és el baix nombre d'enquestes realitzades, tot i que cobreix més del 50% dels pacients pediàtrics amb DT1 actuals de l'hospital, pot presentar una desviació important respecte a la població general. Aquest efecte queda patent en la distribució normal de la durada de la gestació, ja que tant en el grup de pacients amb DT1 com el grup control, tendeixen a allunyar-se de la normalitat encara que la mitjana de la durada de gestació ronda les 39 setmanes. Augmentant el nombre d'enquestes en els 2 grup podria eliminar fàcilment aquesta limitació. La segona limitació és que el grup control no és representatiu de la població general ja que són els germans dels pacients amb DT1, encara que en DT1 pot ser un grup molt interessant d'estudi, ja que tenen major risc de desenvolupar DT1 que la població general. No obstant això, necessitaríem un tercer grup de nens sense DT1 i sense relació consanguínia amb els pacients amb DT1. D'altra banda, un factor prenatal de risc associat a la DT1 és el pes elevat al naixement (Dahlquist et al., 2005; Goldacre, 2018). La nostra població d'estudi presenta un major pes al naixement en el grup de pacients amb DT1 respecte al grup control. Tot i les clares limitacions de l'estudi epidemiològic el fet d'observar efectes ja descrits en altres estudis aporta credibilitat als resultats observats. Coneixent les limitacions i les similituds amb altres estudis es va valorar la correlació de la betametasona prenatal i el desenvolupament de la DT1 en edat pediàtrica. Les dades recollides, de nens nascuts entre el 2000 i el 2017, reflecteixen un major nombre de tractaments amb betametasona en el grup control (12,9%) respecte al grup de pacients amb DT1 (3,23%). Això indica que aquells nens que han sigut tractats prenatalment amb betametasona tenen menys possibilitats de desenvolupar una DT1, a diferència de l'estudi en població danesa (Greene et al., 2013). En l'estudi danès no diferenciaven entre els diferents glucocorticoides administrats. En canvi, les dades preliminars presentades en aquesta tesi només tenen en compte la utilització de betametasona prenatal, per tant, encara que el nombre d'enquestes realitzades sigui petit, ens permet observar la tendència de l'efecte de la betametasona sobre la DT1. Un altre problema és que la betametasona és un fàrmac que s'utilitza quan hi ha risc de part prematur. Aproximadament un 75% dels parts prematurs són tractats amb betametasona a la fase final de la gestació (Meadow et al., 2003) i la incidència mundial de parts prematurs varia entre el 6 i el 12% depenen de l'àrea geogràfica (Beck et al., 2010). A Catalunya, l'any 2017, un 6,2% dels naixements van ser prematurs (Ideescat). Però, aquest risc de part prematur no sempre es compleix i hi ha casos on el naixement del nadó és a partir de les 37 setmanes. Això fa difícil estimar el percentatge real de tractaments

prenatals amb betametasona en la població general a causa de la manca de registres en aquest aspecte, però com a mínim la utilització de betametasona serà superior al 4,5% dels naixements total, valor superior al que s'ha observat en el grup de pacients amb DT1. En resum, les dades preliminars obtingudes suggereixen que la betametasona protegiria enfront del risc de desenvolupament de la DT1 també en humans. Però es necessitarien més dades per tal d'augmentar la solidesa d'aquests resultats trobats en humans.

Encara que la betametasona prenatal protegeixi contra la DT1, els seus efectes en humans no estan perfectament caracteritzats. Les importants diferències entre ratolí i humà (Mestas and Hughes, 2004) fa necessari validar els resultats observats en el model experimental. La necessitat d'ampliar els estudis és cabdal per a poder definir els efectes reals de la betametasona durant l'estat fetal en els humans. En aquest sentit, poder observar com la betametasona interacciona amb el desenvolupament del sistema immunitari humà a partir de precursors hematopoètics seria de gran interès. A més, la betametasona prenatal pot influenciar a augmentar el risc a desenvolupar altres malalties autoimmunitàries (Gieras et al., 2017). Per tant, s'hauria de valorar el possible risc i benefici de la utilització d'aquest fàrmac com a prevenció de la DT1.

En conclusió, els resultats obtinguts en aquesta tesi demostren els efectes de la betametasona en el desenvolupament de la DT1 experimental, bloquejant la resposta autoimmunitària contra la cèl·lula  $\beta$  a causa de la reducció de limfòcits autoreactius i del manteniment de la tolerància perifèrica gràcies a la generació de DCs semi-madures. A més, la betametasona afectarà la cèl·lula  $\beta$  modificant l'expressió gènica i el metabolisme de forma que ajudarà a mantenir l'homeòstasi contribuint a evitar l'inici d'un procés inflamatori. En humans, dades preliminars suggereixen que la betametasona exercirà un efecte similar en el desenvolupament de la DT1 a l'observat en el model experimental. Elucidar els efectes de la betametasona sobre la DT1 i l'autoimmunitat obrirà noves vies a la regulació del sistema immunitari i a la utilització de fàrmacs durant la gestació.



---

---

## *Conclusions*

---

---





## 7. Conclusions

1. L'administració prenatal de betametasona redueix la incidència de DT1 en el model murí de diabetis autoimmune espontània, el ratolí NOD. Aquesta protecció és a causa de les alteracions en poblacions leucocitàries al naixement i a la disminució de les famílies de V $\beta$  del TCR que tenen major afinitat pels autoantígens de la DT1.
2. La betametasona té un efecte tòxic sobre els limfòcits no activats del ratolí NOD. En DCs, la betametasona evita la plena maduració d'aquestes cèl·lules inhibint parcialment la secreció de citocines proinflamatòries i la proliferació de limfòcits T  $\gamma\delta$ . Per tant, la betametasona contribueix a mantenir la tolerància perifèrica i a evitar l'autoimmunitat contra la cèl·lula  $\beta$ .
3. La betametasona indueix canvis en l'expressió gènica de la cèl·lula  $\beta$ , que la protegrien contra l'apoptosi i l'autoimmunitat en dificultar la interacció amb els limfòcits autoreactius. A més, la betametasona atura la proliferació i redueix la secreció d'insulina de forma puntual, alterant l'expressió dels autoantígens. Aquest efecte de la betametasona ajudaria a mantenir l'homeòstasi al teixit diana.
4. Dades epidemiològiques preliminars de DT1 pediàtrica a l'HUGTiP recolzen les evidències trobades en el ratolí NOD sobre la betametasona com a factor prenatal protector en el desenvolupament de la DT1 humana.



## 8. Articles resultants

Articles resultants de la realització de la tesi durant el doctorat:

- Gieras A, Gehbauer C, **Perna-Barrull D**, Engler JB, Diepenbruck I, Glau L, Joosse SA, Kersten N, Klinge S, Mittrücker H-W, Friese MA, Vives-Pi M and Tolosa E (2017) **Prenatal Administration of Betamethasone Causes Changes in the T Cell Receptor Repertoire Influencing Development of Autoimmunity**. *Front. Immunol.* 8:1505. doi: 10.3389/fimmu.2017.01505
- **Perna-Barrull D**, Rodriguez-Fernandez S, Pujol-Autonell I, Gieras A, Ampudia-Carrasco RM, Villalba A, Tolosa E and Vives-Pi M. (2019). **Prenatal Betamethasone interferes with immune system development and alters target cells in autoimmune diabetes**. *Sci. Rep.* 9, 1–15 DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37878-9>

Articles resultats de col·laboració científica durant el doctorat:

- Pujol-Autonell I, Mansilla M J, Rodriguez-Fernandez S, Cano-Sarabia M, Navarro-Barriuso J, Ampudia R M, Rius A, Garcia-Jimeno S, **Perna-Barrull D**, Martinez-Caceres E, MasPOCH D and Vives-Pi M. **Liposome-based immunotherapy against autoimmune diseases: therapeutic effect on multiple sclerosis**. *Nanomedicine [London]*. 2017 Jun; 12(11):1231–42. Doi: 10.2217/nnm-2016-0410
- Rodriguez-Fernandez S, Pujol-Autonell I, Brianso F, **Perna-Barrull D**, Cano-Sarabia M, Garcia-Jimeno S, Villalba A, Sanchez A, Aguilera E, Vazquez F, Verdager J, MasPOCH D and Vives-Pi M (2018). **Phosphatidylserine-Liposomes Promote Tolerogenic Features on Dendritic Cells in Human Type 1 Diabetes by Apoptotic Mimicry**. *Front. Immunol.* 9:253. doi: 10.3389/fimmu.2018.00253
- Villalba A, Fonolleda M, Murillo M, Rodriguez-Fernandez S, Ampudia RM, **Perna-Barrull D**, Raina MB, Quirant-Sanchez B,

Planas R, Teniente-Serra A, Bel J, Vives-Pi M. **Partial remission and early stages of pediatric type 1 diabetes display immunoregulatory changes. A pilot study.** M. Transl Res. 2019 Mar 15. pii: S1931-5244(19)30053-2. doi: 10.1016/j.trsl.2019.03.002. PMID: 30953609

- Villalba A, Rodriguez-Fernandez S, Ampudia RM, Cano-Sarabia M, **Perna-Barrull D**, Bertran-Cobo C, Ehrenberg C, MasPOCH D, Vives-Pi M. **Phosphatidylserine-liposomes with insulin peptides but not other autoantigens prevents experimental type 1 diabetes.** Nanomedicine (UK), submitted to Artif Cell Nanomed Biotech. In press Oct 2019

Divulgació científica durant el doctorat

- **Perna-Barrull D. Del ojo al microscopio: diabetes mellitus tipo 1 y autoinmunidad**, Revista de la asociación Granadina de diabetes (AGRADI) nº 37/18:4-8. 2018



# Prenatal Administration of Betamethasone Causes Changes in the T Cell Receptor Repertoire Influencing Development of Autoimmunity

Anna Gieras<sup>1\*</sup>, Christina Gehbauer<sup>1</sup>, David Perna-Barrull<sup>2</sup>, Jan Broder Engler<sup>3</sup>, Ines Diepenbruck<sup>1</sup>, Laura Glau<sup>1</sup>, Simon A. Joosse<sup>4</sup>, Nora Kersten<sup>1</sup>, Stefanie Klinge<sup>1</sup>, Hans-Willi Mittrücker<sup>1</sup>, Manuel A. Friese<sup>3</sup>, Marta Vives-Pi<sup>5</sup> and Eva Tolosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, <sup>2</sup>Immunology Division, Germans Trias i Pujol Research Institute and Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain, <sup>3</sup>Institute of Neuroimmunology and Multiple Sclerosis, Center for Molecular Neurobiology Hamburg, Hamburg, Germany, <sup>4</sup>Department of Tumor Biology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, <sup>5</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Wanjun Chen,  
National Institutes of Health (NIH),  
United States

### Reviewed by:

Philippe Saas,  
Établissement Français du Sang,  
France  
Xue Jiao,  
Shandong University, China

### \*Correspondence:

Anna Gieras  
a.gieras@uke.de

### Specialty section:

This article was submitted  
to T Cell Biology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 24 August 2017

**Accepted:** 25 October 2017

**Published:** 13 November 2017

### Citation:

Gieras A, Gehbauer C,  
Perna-Barrull D, Engler JB,  
Diepenbruck I, Glau L, Joosse SA,  
Kersten N, Klinge S, Mittrücker H-W,  
Friese MA, Vives-Pi M and Tolosa E  
(2017) Prenatal Administration  
of Betamethasone Causes  
Changes in the T Cell Receptor  
Repertoire Influencing  
Development of Autoimmunity.  
*Front. Immunol.* 8:1505.  
doi: 10.3389/fimmu.2017.01505

Prenatal glucocorticoids are routinely administered to pregnant women at risk of preterm delivery in order to improve survival of the newborn. However, in half of the cases, birth occurs outside the beneficial period for lung development. Glucocorticoids are potent immune modulators and cause apoptotic death of immature T cells, and we have previously shown that prenatal betamethasone treatment at doses eliciting lung maturation induce profound thymocyte apoptosis in the offspring. Here, we asked if there are long-term consequences on the offspring's immunity after this treatment. In the non-obese diabetic mouse model, prenatal betamethasone clearly decreased the frequency of pathogenic T cells and the incidence of type 1 diabetes (T1D). In contrast, in the lupus-prone MRL/lpr strain, prenatal glucocorticoids induced changes in the T cell repertoire that resulted in more autoreactive cells. Even though glucocorticoids transiently enhanced regulatory T cell (Treg) development, these cells did not have a protective effect in a model for multiple sclerosis which relies on a limited repertoire of pathogenic T cells for disease induction that were not affected by prenatal betamethasone. We conclude that prenatal steroid treatment, by inducing changes in the T cell receptor repertoire, has unforeseeable consequences on development of autoimmune disease. Our data should encourage further research to fully understand the consequences of this widely used treatment.

**Keywords:** glucocorticoids, prenatal betamethasone, T cell repertoire, autoimmunity, type 1 diabetes, non-obese diabetic mice, experimental autoimmune encephalomyelitis mice, MRL/lpr

## INTRODUCTION

Non communicable diseases (NCDs), such as cardiovascular diseases, diabetes, chronic respiratory diseases, and others, result from a combination of risk factors and are the leading cause for almost 70% of all deaths worldwide (1). Among these, autoimmune diseases are responsible for more than 5% deaths every year (2), and their incidence is steadily increasing (3, 4). Emerging

evidence suggests that prenatal and early life conditions, such as environmental exposure to pollutants, poor nutrition, stress, or medical interventions during pregnancy might act as pivotal determinants of NCD risk in later life (5). Fetal exposure to synthetic glucocorticoids, as consequence of antenatal corticosteroid (ACS) administration to the mother, constitutes a potentially amendable risk factor. ACS is the most important obstetric intervention available to reduce the occurrence and severity of respiratory distress syndrome and to improve the survival chances in premature infants (6). According to WHO recommendations, glucocorticoids (either betamethasone or dexamethasone) are given to mothers at risk of preterm birth between 24 and 34 weeks of gestation (7). The synthetic glucocorticoids cross the placenta and accelerate fetal lung maturation, achieving maximum benefit from 24 h to 7 days after administration (8). After injection, glucocorticoid bioactivity in the fetus lasts for several days (9) and can exert long-lasting effects upon the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and cognition in children (10, 11). Of note, 30–80% of women with symptoms of preterm birth have not delivered 14 days later (12), and more than half of the women who received ACS delivered later than one week after treatment or after 34 weeks of gestation (13), among them one third after gestation week 37 (14). Especially this population of neonates is likely to encounter more harm than benefits from the prenatal treatment with glucocorticoids.

Known as strong immune modulators, glucocorticoids act on a great variety of immune cells and have potent effects on the development of T lymphocytes. Exposure of developing thymocytes to glucocorticoids results in apoptotic death of the immature CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-positive (DP) subset (15), and we have previously shown that antenatal betamethasone treatment leads to a drastic decrease in the thymus volume and thymocyte numbers in the offspring (16). In order to sustain T cell output, the thymic niche is promptly replenished by newly imported hematogenous early thymic progenitors (17, 18), which will then proceed to the rearrangement of their T cell receptor (TCR) creating a highly diverse TCR repertoire and undergo positive and negative selection processes: thymocytes bearing non-functional TCRs or TCR with high affinity for self-peptide:MHC are deleted, while T cells with lower affinity TCRs mature and populate the periphery [reviewed in Ref. (19)]. However, even in healthy individuals, a number of autoreactive T cells escape this central tolerance checkpoint and migrate to the periphery, where peripheral tolerance mechanisms are engaged to prevent overt autoimmunity. Among these, thymic-derived Foxp3<sup>+</sup> Treg cells and, in particular, a highly efficient population of Treg cells generated perinatally, are essential in preventing multiorgan autoimmune disease (20–23).

The delicate process of T cell repertoire selection may be compromised under altered glucocorticoid signaling (24–29), and as a consequence may have detrimental long-lasting effects on immunopathology and susceptibility to diseases. Therefore, we sought to investigate the influence of ACS treatment on the development of autoimmunity later in life. Using two mouse strains that spontaneously develop autoimmunity, namely the lupus-prone MRL/lpr strain and the non-obese diabetic (NOD) mouse, and the myelin oligodendrocyte glycoprotein

(MOG)-induced mouse model for multiple sclerosis [experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)], we provide evidence that prenatal betamethasone treatment, by inducing changes in the T cell repertoire, can alter the course of autoimmune disease.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice and Treatment

C57BL/6J, MRL/MpJ-*Fas*<sup>lpr</sup>/J, NOD mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA), and Foxp3<sup>RFPE</sup> reporter mice (30), kindly provided by S. Huber, were housed and maintained under specific pathogen-free conditions. Mice were mated and the presence of a vaginal plug was considered day 0.5 of pregnancy (E0.5). On day 18.5 (E18.5) mice were treated by i.p. injection of 0.1 mg betamethasone (Sigma-Aldrich, Germany) in PBS or vehicle control (PBS). When indicated, 4- to 5-week-old animals were given 0.1 mg betamethasone i.p. or vehicle control (PBS) 24 h prior to organ harvesting. All animal experiments were performed in accordance with national and institutional guidelines on animal care and ethics.

### Flow Cytometry

Thymi, lymph nodes and spleens were harvested and single-cell suspensions prepared by mechanical disruption and filtering through a 70 µm nylon mesh. Red blood cells were lysed when necessary and Fc receptors were blocked using anti-CD16/32 Abs prior to staining. Anti-mouse Abs used in this study were: anti-CD3e eFluor 450 (500A2), anti-CD4 APC-eFluor 780 (RM4-5) and anti-CD8α PE-Cy7 (53-6.7) from eBioscience (San Diego, CA, USA); anti-CD4 FITC (RM4-5), anti-CD4 BV421 (GK1.5), anti-CD8α PerCP-Cy5.5 (53-6.7), anti-CD25 PE (3C7), and anti-TCRβ chain PerCP-Cy5.5 (H57-597) from BioLegend (San Diego, CA, USA), and anti-CD3e FITC (145-2C11) from BD Biosciences (San Jose, CA, USA).

Analysis of TCR Vβ usage was performed using 15 FITC-conjugated monoclonal antibodies recognizing the TCR chains Vβ2, 3, 4, 5.1/5.2, 6, 7, 8.1/8.2, 8.3, 9, 10<sup>b</sup>, 11, 12, 13, 14, and 17<sup>a</sup> TCRs (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The percentage of Vβ<sup>+</sup> cells was determined in each subset after gating on CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and DN cells.

Data were collected on a Flow Cytometer (FacsCanto II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed using FlowJo Software (Tree Star, Ashland, OR, USA). Cell sorting of thymocyte populations was performed on a FACS Aria IIIu (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) carried out by the FACS sorting Core Unit of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf.

### Thymocyte Sensitivity to Betamethasone

One million thymocytes from 5-weeks-old untreated C57BL/6J mice were cultured in RPMI-1640 (Gibco, CA, USA) in a 96-well round bottom plate (Thermo Fisher Scientific, Germany) and incubated with increasing concentrations of betamethasone (0.1–100 nM) with or without the addition of 1 µg/ml mifepristone (RU486, Sigma-Aldrich). After 16 h at 37°C, cells were harvested, washed with 1 × Annexin V Binding Buffer (Exbio,

Czech Republic) and subsequently stained for lineage markers (CD3, CD4, CD8, CD25). For detection of dead and apoptotic cells, Dead Cell Stain-Pacific Orange (Invitrogen, CA, USA) and Annexin V FITC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) were used according to the manufacturer's instructions.

## Autologous Mixed Lymphocyte Reaction (AMLR)

Pooled single-cell suspensions from inguinal, axillary, brachial, lumbar, and superficial cervical lymph nodes were stained with the cell proliferation dye eFluor 670<sup>®</sup> (eBioscience, San Diego, CA, USA) in order to differentiate proliferating and non-proliferating cells. Shortly, lymph node cells were washed with PBS and resuspended in 2  $\mu$ M eFluor 670<sup>®</sup> dye in PBS for 10 min at 37°C in the dark. Labeling was stopped by adding 4–5 volumes of cold complete medium (RPMI 1640, 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine, 50  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol) and incubated on ice for 5 min. Labeled cells were then cultured in complete medium in the presence or absence of IL-2 (100 U/ml). Cells were plated at  $1 \times 10^5$ /well in a 96-well plate (Thermo Fisher Scientific, Germany) for up to 5 days at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. After 3, 4, and 5 days of culture, lymph node cells were collected, washed with PBS and stained with Dead Cell Stain-Pacific Orange and anti-TCR $\beta$  chain PerCPCy5.5, anti-CD4 APC-eFluor 780, and anti-CD8 $\alpha$  PE-Cy7 antibodies. The proliferation of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and DN cells was evaluated according to eFluor dilution measured by flow cytometry (FacsCanto II, BD Biosciences).

## Disease Scoring MRL/lpr Mice

Organ weights were measured and weight index (mg/g body weight) of lymphoid organs (spleen and lymph nodes) was calculated as follows: organ weight/body weight  $\times$  1,000.

### Measurement of Double-Stranded (ds) DNA Autoantibodies

Blood samples were collected every 2 weeks starting at 6 weeks of age and serum autoantibodies specific for dsDNA were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). 96-well plates were coated with 5  $\mu$ g/ml calf thymus dsDNA (Sigma-Aldrich) at 4°C overnight. Plates were blocked for 2 h with 1% BSA in PBS followed by incubation with diluted mouse serum for 2 h at RT. Bound anti-dsDNA autoantibodies were detected with a 1:2,000 diluted sheep anti-mouse IgG-HRP (Amersham, UK) (2 h, RT), and peroxidase reaction was developed using 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (Sigma-Aldrich, Germany). Absorbance was measured at 405 nm using a multilabel plate reader (Victor3, PerkinElmer, MA, USA), data were analyzed using Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

### Measurement of Proteinuria

Mice were housed in metabolic cages for urine collection for 2 h every 2 weeks starting at 6 weeks of age. Albuminuria was determined by ELISA (Mouse Albumin ELISA Quantitation Set; Bethyl Laboratories, Inc.).

## Non-Obese Diabetic (NOD) Mice

Starting at 10 weeks of age, adult mice were monitored daily for urine glucose using Glucocard strips (Menarini, Barcelona, Spain), until 25 weeks of age. Mice with glycosuria were confirmed diabetic when the blood glucose level was  $>300$  mg/dl. The degree of immune cell infiltration in the islets (insulinitis score) was determined at the end of the study in all non-diabetic mice. Briefly, pancreata were snap frozen in an isopentane/cold acetone bath. Cryosections of 5  $\mu$ m were obtained at non-overlapping levels, stained with hematoxylin and eosin (H&E), and analyzed by two independent investigators in a blind fashion. A minimum of 40 islets per animal was analyzed. Insulinitis was scored as described elsewhere (31): 0 = no insulinitis; 1 = peri-insular inflammation; 2 = infiltration below 25%; 3 = infiltration 25–75%; 4 = infiltration above 75%.

## EAE Mouse Model

For induction of EAE, C57BL/6J mice were immunized s.c. with 200  $\mu$ g MOG<sub>35–55</sub> peptide (Schafer-N, Copenhagen, Denmark) in complete Freund's adjuvant (Difco Laboratories, LI, USA) containing 4 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* (Difco). In addition, 200 ng pertussis toxin (Calbiochem, San Diego, CA, USA) was injected i.v. on the day of immunization and 48 h later. Animals were scored daily for clinical signs by the following system: 0 = no clinical deficits; 1 = tail weakness; 2 = hind limb paresis; 3 = partial hind limb paralysis; 3.5 = full hind limb paralysis; 4 = full hind limb paralysis and forelimb paresis; and 5 = premonitory or dead. Animals reaching a clinical score  $\geq 4$  had to be killed according to the regulations of the Animal Welfare Act. Investigators were blinded for prenatal treatment during the experiments.

## Gene Expression Analysis

RNA was extracted from sorted T cell subsets or from thymocytes after *in vivo* or *in vitro* treatment using the RNeasy Mini Plus kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and cDNA was synthesized with the M-MLV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen). TaqMan gene expression assay (Life Technologies, CA, USA) was used to detect *GAPDH* (Hs02758991\_g1) expression. 18S and FoxP3 expression were determined using SYBR<sup>®</sup> green and following primers: 18S forward: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'/18S reverse: 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'; FoxP3 forward: 5'-GGCCCTTCTCCAGGACAGA-3'/FoxP3 reverse: 5'-GCTGATCATGGCTGGGTTGT-3'.

## Statistics

Statistical analysis of TCR V $\beta$  chain usage was performed with Matlab R2016b (The Mathworks). The fractions of positive cells for each V $\beta$  chain, as well as the remaining fraction of cells that was not positive for any of the measured V $\beta$  chains (other V $\beta$ ), were log or square-root transformed to obtain normally distributed data. Using *N*-way ANOVA, the V $\beta$  chain fractions for each cell type were correlated to treatment and possible interaction terms, with correction for litter size and subject nested within treatment. Upon reaching statistical significance, pairwise comparison with Fisher's least significant difference correction was performed



to identify which V $\beta$  chain(s) were differently expressed upon treatment. For calling statistical significance, alpha of 0.05 was applied in all analyses.

Additional statistical analysis, including unpaired Student's *t*-test, Gehan–Breslow–Wilcoxon test, and Mantel–Cox test were performed with GraphPad Prism Software (La Jolla, CA, USA) and are indicated in the corresponding figure legends. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, and \*\*\*\**P* < 0.0001.

## Study Approval

This study was carried out in accordance with the recommendations of the Declaration of Helsinki for animal experimental investigation and the Principles of Laboratory Animal Care (NIH pub.85–23 revised 1985). The protocol was approved by the local animal ethics committees (ethical approval 119/13 and 122/12 obtained from the state authority of Hamburg, and DMAH8948 obtained from the Generalitat de Catalunya).

## RESULTS

### Prenatal Glucocorticoid Treatment Results in Apoptosis of DP Thymocytes in the MRL/lpr Offspring

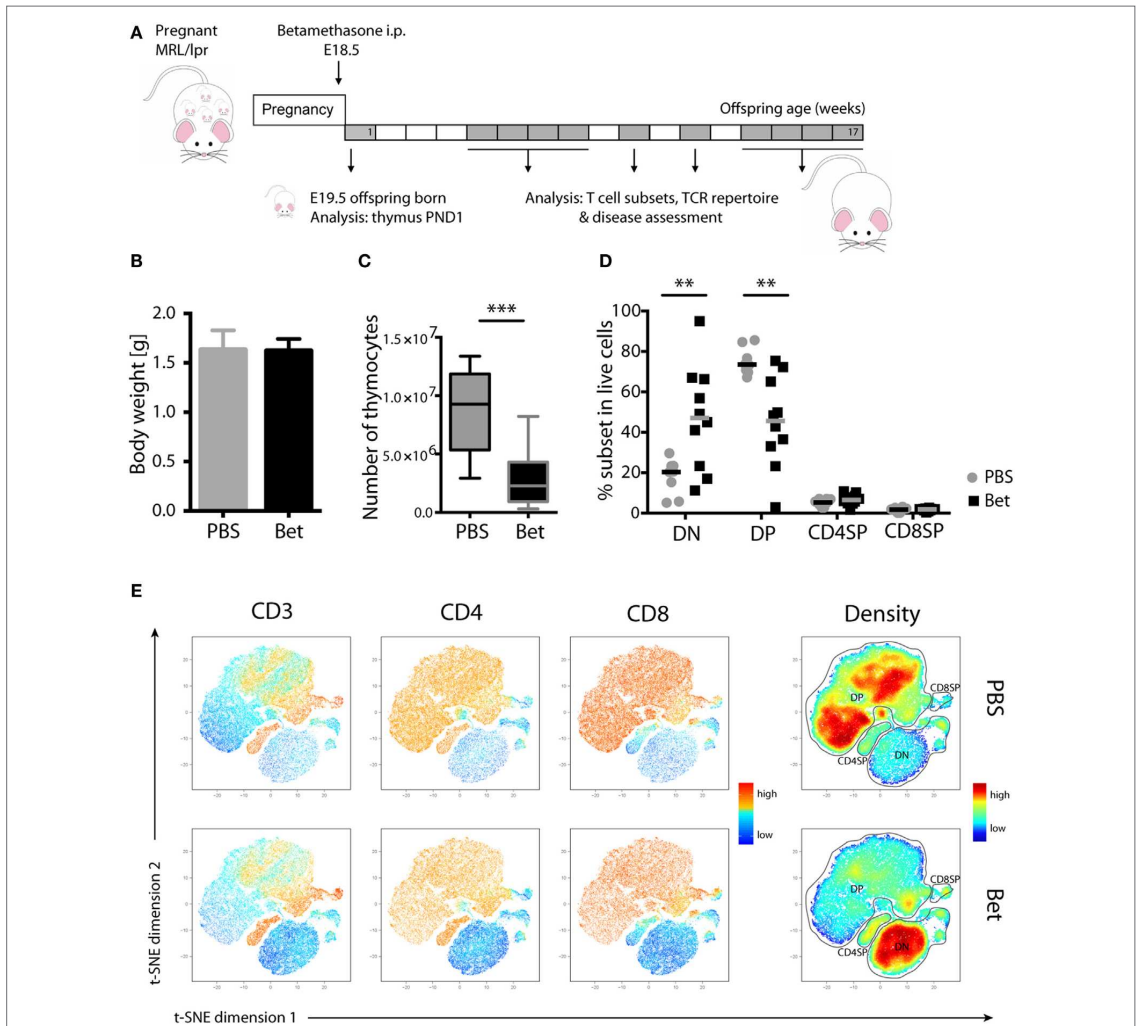
We have previously shown in C57BL/6J mice that prenatal betamethasone treatment causes a profound reduction in the thymic volume and cell numbers in the offspring (16). The question that arises is if the massive death and subsequent accelerated replenishment of the thymus has consequences upon T cell repertoire selection and immunity later in life. To explore this, we took advantage of the MRL/MpJ-*Fas*<sup>lpr</sup> (hereafter referred to as MRL/lpr) autoimmunity-prone mouse strain, which spontaneously develops lupus-like glomerulonephritis and vasculitis as result of autoantibody production and immune complex deposition (32). In this strain, we first sought to confirm the effects of prenatal glucocorticoid treatment on the thymus. After treating the pregnant dams (E18.5) with betamethasone (Figure 1A), at postnatal day 1 (PND1) we did not observe any difference in the weight of the pups (Figure 1B), but a drastic reduction in the number of living thymocytes (Figure 1C). Not surprisingly, thymocyte loss was caused by a massive reduction in the CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP compartment and, as a consequence, a compensational increase in the frequency of DN cells (Figures 1D,E) could be observed. This effect was transient, since in the adult offspring the percentage of DP thymocytes was similar in both groups (not shown). Figure 1E shows a direct comparison of the composition of the thymocyte compartment in a sham- (upper row) vs. a betamethasone-treated (lower row) animal. The density plot in the right panels demonstrates the shift from maximal representation of DP cells in the untreated animals to a maximum of DN cells in the animals treated with betamethasone. Importantly, the range of DP cell loss within a litter was highly variable, with some animals displaying marginal effects while others have nearly lost the DP compartment (Figure 1D). This variation is likely the result of different exposure of each individual fetus to betamethasone (16). The frequencies of CD4SP and CD8SP

cells remained similar, although we could notice a reduction in absolute cell counts (not shown).

### Prenatal Betamethasone Treatment Leads to Changes in the T Cell Repertoire of MRL/lpr Offspring

We next asked if the massive perinatal thymocyte death had long lasting consequences on the peripheral T cell compartment. While the MRL strain is prone to autoreactivity, the defect in *fas* (*lpr*, lymphoproliferation) leads to uncontrolled expansion and accumulation of autoreactive cells in the peripheral lymphoid organs, and accelerates, rather than initiates, disease (33). These autoreactive cells harbor the phenotype CD3<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (DN T cells), and steadily increase with disease progression to become the most abundant subset in spleen and lymph nodes. Importantly, the TCR V $\beta$  usage of public clones in the enlarged lymph nodes and in T cells infiltrating the kidneys of diseased animals is limited to a few families, including V $\beta$ 2, V $\beta$ 6, V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 8.3, and V $\beta$ 10, underlining their pathogenic relevance (34–36). To assess if prenatal glucocorticoid treatment had an effect on the autoimmune repertoire, we performed flow cytometric analysis of TCR V $\beta$  chain usage in peripheral CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and DN T cells of young (5- to 7-week old) and aged (15- to 17-week old) offspring of mothers treated with vehicle or betamethasone. While the frequencies of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and DN T cells at 5–7 weeks of age, before appearance of disease symptoms, were similar in both groups, accumulation of DN T cells in the older animals was clearly more prominent in the group that had received betamethasone prenatally (Figures 2A,B). Moreover, analysis of V $\beta$  chain usage on the different T cell subsets indicated a bias in TCR receptor V $\beta$  expression in these mice, with higher representation of the potentially autoreactive V $\beta$ 2- (7.97 vs 8.95%, *P* = 0.0564), V $\beta$ 8.1/8.2- (10.91 vs 12.85%, *P* = 0.0379), and V $\beta$ 10<sup>b</sup>- (1.97 vs 2.85%, *P* = 0.0113) expressing DN T-cells in young animals (5–7 weeks) (Figures 2C,E) and further differences in the frequency of V $\beta$ 5.1 CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells, V $\beta$ 11 in CD4<sup>+</sup> T cells, and V $\beta$ 12 in CD4<sup>+</sup> T and DN T cells (Table S1 in Supplementary Material). Similarly, the TCR V $\beta$  usage in MRL/lpr animals with advanced disease (at 15–17 weeks of age) was also biased, with differences in the frequency of V $\beta$ 14 (7.46 vs 8.46%, *P* = 0.0114) CD8<sup>+</sup> T cells and, as in young animals, in the disease-relevant V $\beta$ 10<sup>b</sup> (4.78 vs 6.18%, *P* = 0.0389) bearing DN cells (Figures 2D,F; Table S2 in Supplementary Material).

We next sought to determine whether the changes observed in the TCR V $\beta$  repertoire resulted in a higher proliferation, which would reflect the presence of more autoreactive cells. For this, we performed AMLR to measure proliferation of autoreactive T cells in response to endogenous antigens. While no external TCR stimulus was given, IL-2 was added to the cultures to support the incipient proliferation of the few autoreactive precursors. Although not significant, our data show higher proliferation rates of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in the betamethasone-exposed animals (Figure 2G). As expected, DN cells showed maximal proliferation, and no differences were found between the treated and non-treated groups, since the accumulating DN cells are chronically activated in both groups.



**FIGURE 1** | Loss of double-positive (DP) thymocytes in the offspring of MRL/lpr mice after prenatal betamethasone treatment. **(A)** Schematic representation of the MRL/lpr mouse model. **(B)** Body weight from prenatally betamethasone (Bet) and vehicle-treated (PBS) MRL/lpr mice ( $n = 42\text{--}44$  per group, male and female). **(C)** Total number of thymocytes ( $n = 10\text{--}11$  per group, male). **(D)** Frequency of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> double-negative (DN), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP, and mature CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> single-positive (SP) thymocytes ( $n = 8\text{--}10$  per group, male). **(E)** t-SNE representation of the surviving cells in the thymic compartment after prenatal betamethasone treatment according to the expression of CD3, CD4, and CD8. Each dot represents a cell, and the colors show levels of expression of the indicated markers. The plots show one representative animal per group. The rightmost plots display the cell abundance (density) for each population. All analyses were performed at postnatal day 1 (PND1). Unpaired Student's *t*-test was used for statistical analysis, \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

The *lpr* defect in this mouse strain leads to a progressive enlargement of the lymphoid organs, enhancing the disease phenotype of the MRL strain (33). Therefore, we would expect that a T cell repertoire biased toward more autoreactivity would result in larger lymphoid organs. In agreement with increased amounts of pathogenic TCR V $\beta$  families and enhanced T cell proliferation, the spleens and lymph nodes were considerably larger in the animals whose mothers had been treated with betamethasone

(Figures 2H,I), supporting the concept of a more autoreactive T cell repertoire. However, a higher frequency of autoreactive T cells and enlarged lymphoid organs did not translate in accelerated course of disease, as assessed by the levels of dsDNA autoantibodies (Figure 2J) and proteinuria (Figure S1 in Supplementary Material) from 6 to 16 weeks of age, which were similar in both groups. Of note, prenatal betamethasone treatment resulted in a transiently lower body weight (Figure 2K) and higher production

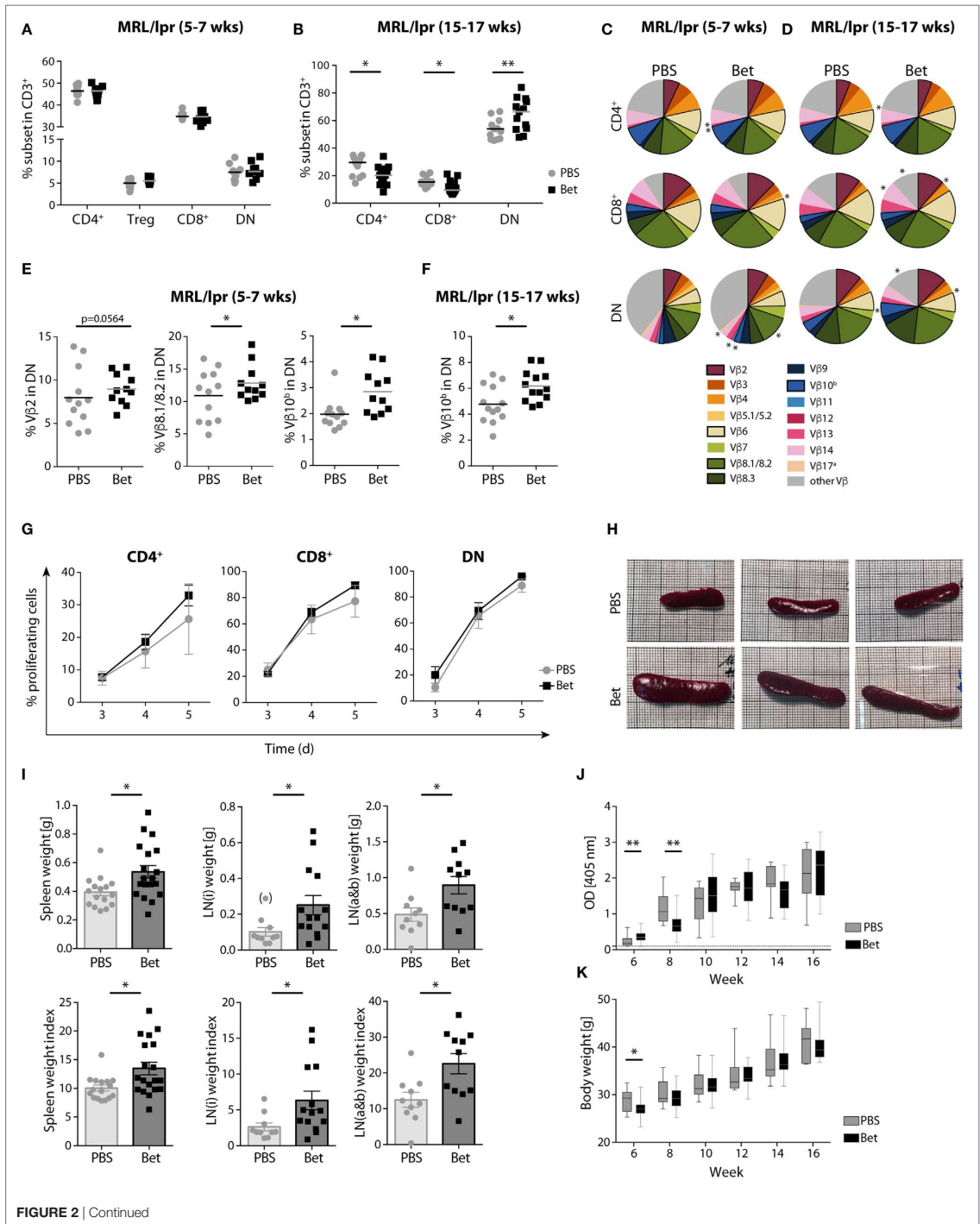


FIGURE 2 | Continued

**FIGURE 2** | Continued

Long-term effects of prenatal steroid treatment in MRL/lpr offspring. Frequencies of spleen T cell subsets CD4<sup>+</sup>, Treg cells, CD8<sup>+</sup>, and DN cells at **(A)** 5–7 weeks and **(B)** 15–17 weeks of age ( $n = 11–13$  per group, male and female). **(C,D)** T cell receptor (TCR) V $\beta$  chain usage among CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and DN splenocytes at **(C)** 5–7 ( $n = 11–12$  per group, male and female) and **(D)** 15–17 weeks of age ( $n = 13$  per group, male and female) was assessed by flow cytometry. Each of the 15 analyzed TCR V $\beta$  chain families is represented by a segment proportional in size to its frequency (which on average cover between 61 and 91% of all cells within the subsets, the segment “other V $\beta$ ” indicates V $\beta$  chain expression not covered by our panel of TCR V $\beta$  chain-specific Abs). Segments marked with an asterisk differ statistically significant between the groups (PBS or Bet), framed segments indicate TCR V $\beta$  chains important for autoimmune disease in MRL/lpr mice. **(E)** Detailed results for the relevant TCR V $\beta$ 2, V $\beta$ 8.1/8.2, and V $\beta$ 10<sup>a</sup> in DN spleen cells at 5–7 weeks of age. **(F)** Detailed results for the relevant TCR V $\beta$ 10<sup>b</sup> in DN spleen cells at 15–17 weeks of age. *N*-way ANOVA was used for statistical analysis of TCR V $\beta$  chain usage. **(G)** Proliferation of autoreactive CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and DN cells from female MRL/lpr mice ( $n = 3–4$  per group at 6–8 weeks). Pooled lymph node cells ( $1 \times 10^6$ ) were cultured in the presence of IL-2 (100 U/ml) without the addition of exogenous TCR stimulation for 3–5 days. Extent of cell proliferation was analyzed by flow cytometry based on eFluor 670 dilution. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. **(H–K)** Disease parameters in MRL/lpr mice: **(H)** Size of spleen at 15 weeks of age. Effect of prenatal betamethasone treatment on **(I)** spleen MRL/lpr mice ( $n = 16–19$  per group) and lymph node ( $i =$  inguinal,  $n = 10–14$  or  $a \& b =$  axillary and brachial,  $n = 10–11$  per group) weights and indices (mg/g body weight), **(J)** serum levels of dsDNA autoantibodies ( $n = 7–28$  per group and time point), and **(K)** body weight ( $n = 9–29$  per group and time point). Unpaired Student's *t*-test was used for statistical analysis; \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ .

of ds-DNA specific IgG autoantibodies (**Figure 2J**) at 6 weeks of age, but this difference disappeared soon after. Thus, prenatal treatment of the pregnant females with betamethasone elicits drastic thymocyte death in the postnatal thymus, which results in persistent changes in the TCR repertoire promoting the expansion of autoreactive V $\beta$  families.

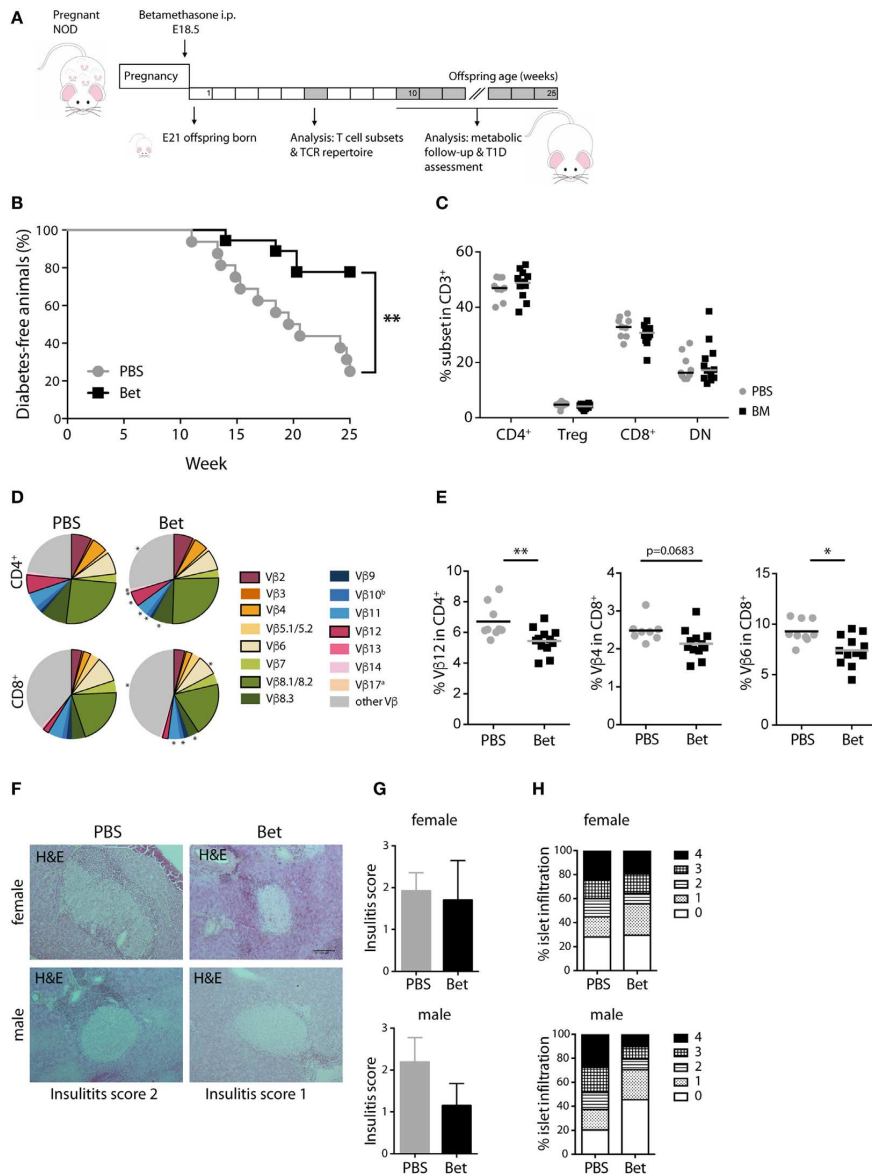
## Prenatal Betamethasone Protects from T1D Development in NOD Mice

Despite the critical role of T cells in the initiation of autoimmunity in MRL/lpr mice, other mechanisms such as the production of pathogenic autoantibodies and renal immune-complex deposition leading to complement activation, contribute fundamentally to disease progression. Therefore, we turned to a second model of autoimmunity with a more direct involvement of T cells in the immune pathogenesis, the NOD mouse model for T1D to assess persisting effects of prenatal betamethasone treatment. This spontaneous model of autoimmune diabetes is characterized by the activation of autoreactive T cells and the destruction of insulin producing beta-cells in the pancreas. After prenatal administration of vehicle or betamethasone to non-diabetic females (E 18.5), glucose levels were measured in the female offspring for the occurrence of T1D until 25 weeks of age (**Figure 3A**). Surprisingly, we found that fetal glucocorticoid exposure was protective against the development of T1D in females (**Figure 3B**). At 25 weeks of age, only 25% of the NOD females in the control group were disease-free, while in the betamethasone treatment group it was 78%. Moreover, T1D onset was delayed in the treated group (from 14 weeks of age) when compared to control mice (from 11 weeks of age), consistently with the protective effect of the drug. There were no differences between the two groups in the frequencies of CD4<sup>+</sup>, Treg cells, CD8<sup>+</sup>, or CD3<sup>+</sup> DN spleen cells at 6 weeks of age (**Figure 3C**). We next investigated whether the different incidence of disease could be traced to changes in the TCR V $\beta$  repertoire. In the NOD mice, the most commonly found TCR V $\beta$  chains in T cells infiltrating the pancreas are V $\beta$ 4 (37), and V $\beta$ 12 (38, 39), followed by V $\beta$ 8.1, V $\beta$ 2, and V $\beta$ 6 (40, 41). Our TCR V $\beta$  usage analysis revealed that V $\beta$ 12 (6.71 vs. 5.45%,  $P = 0.0077$ ) CD4<sup>+</sup> T cells, and V $\beta$ 4 (2.66 vs. 2.14%,  $P = 0.0683$ ) and V $\beta$ 6 (9.28 vs. 7.39%,  $P = 0.0124$ ) CD8<sup>+</sup>

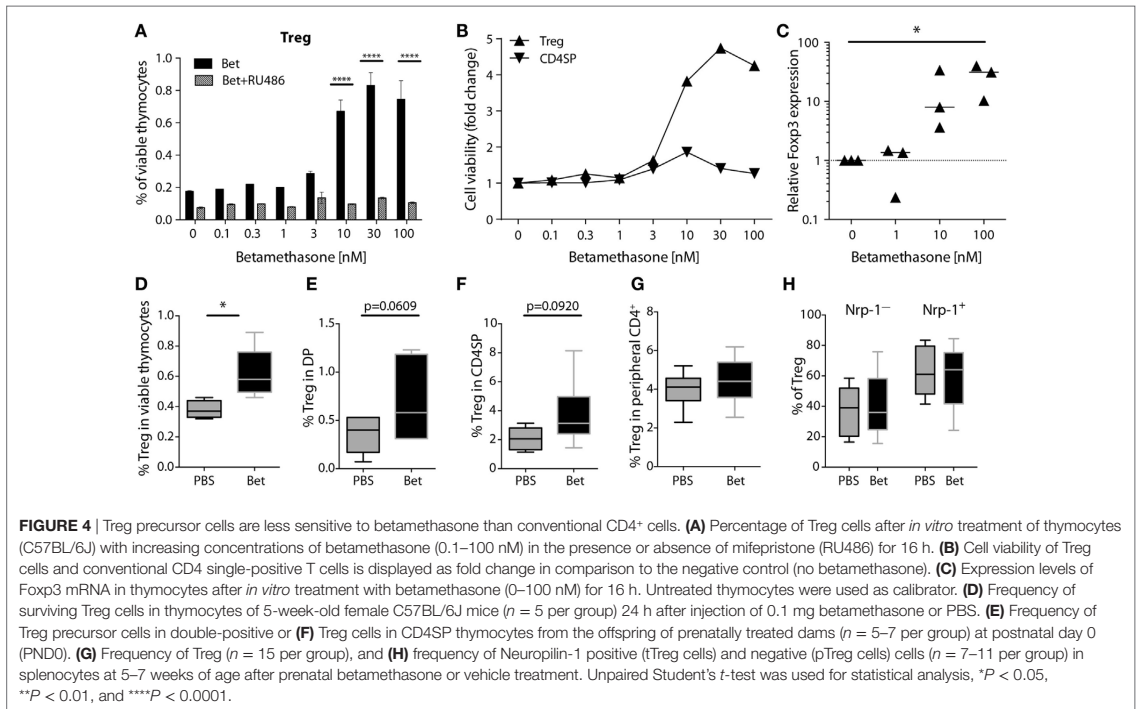
T cells were underrepresented in the spleen of the female NOD mice whose mothers received betamethasone (**Figures 3D,E**; Table S3 in Supplementary Material). This lower frequency of pathogenic TCRs was reflected in the lower degree of immune cell infiltration in the pancreas of animals that had not yet developed T1D at 25 weeks of age, determined in a second mouse cohort (**Figures 3F–H**). Here, the incidence was somewhat lower in both groups, but still 46% of sham-treated females were disease-free at 25 weeks, while 62% of the betamethasone-treated had normal glucose levels ( $P = 0.0847$ , Figure S2 in Supplementary Material). Therefore, we conclude that a bias in the T cell repertoire caused by prenatal glucocorticoid treatment contributes to protection from T1D in the NOD mice.

## Prenatal Betamethasone Does Not Induce Long Lasting Changes in the Treg Cell Compartment

In addition to changes in TCR V $\beta$  usage, another possibility that could affect development of autoimmunity is the quantity or quality of Treg cells. Treg cells are less sensitive to glucocorticoid challenge than conventional CD4<sup>+</sup> cells (42, 43). However, it is not known if prenatal treatment with betamethasone results in enrichment of Treg cells in the newborn and, more importantly, if there are consequences for the peripheral Treg cell compartment later in life. In a first set of experiments we exposed thymocytes from 6 weeks old (not prenatally treated) C57BL/6J mice to increasing concentrations (0.1–100 nM) of betamethasone *in vitro* and measured the survival of Treg cells compared to conventional CD4<sup>+</sup> T cells. We used mifepristone (RU486), a synthetic steroid with potent anti-glucocorticoid properties, to confirm the specificity of the betamethasone effects. We found that the relative frequency of surviving CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> SP thymocytes (which in the naïve mice are considered Treg cells) increased in response to betamethasone in a dose-dependent manner, and this effect was completely inhibited by the addition of RU486 (**Figure 4A**). More than a threefold increase in the frequency of Treg cells compared to the untreated controls was achieved at 10 nM (**Figure 4A**). In contrast, conventional CD4<sup>+</sup> single-positive thymocytes did not significantly change in proportion with increasing concentrations of betamethasone (**Figure 4B**). To confirm that it is indeed



**FIGURE 3** | Prenatal steroid treatment reduces insulinitis and the incidence of T1D in NOD mice. **(A)** Schematic representation of the NOD mouse model. **(B)** Percentage of T1D-free NOD mice during 25 weeks of follow-up ( $n = 16$ – $18$  females per group). Gehan–Breslow–Wilcoxon test was used for statistical analysis. **(C)** Frequency of CD4<sup>+</sup>, Treg cells, CD8<sup>+</sup>, and DN splenocytes from female NOD mice at 6 weeks ( $n = 9$ – $12$  per group). **(D)** Comparison of Vβ chain usage between NOD offspring from betamethasone- (Bet) and sham-treated (PBS) dams at 6 weeks of age ( $n = 9$ – $12$  per group, female). Each T cell receptor (TCR) Vβ chain among CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells is represented by a segment proportional in size to its frequency (which on average cover between 55 and 78% of all cells within the T cell subsets, the segment “other Vβ” indicates Vβ chain expression not covered by our panel of TCR Vβ chain-specific Abs). Segments marked with a star differ statistically significant between the groups (PBS or Bet), framed segments indicate TCR Vβ chains important for autoimmune disease in NOD mice. **(E)** Detailed results for the relevant TCR Vβ12 in CD4<sup>+</sup> and TCR Vβ4 and Vβ6 in CD8<sup>+</sup> spleen cells. *N*-way ANOVA was used for statistical analysis of TCR Vβ chain usage. **(F)** Representative H&E stained sections of pancreata from male and female T1D-free mice at sacrifice (25 weeks). **(G)** Insulinitis score and **(H)** percentage of islets (presented as degree of infiltration: 0 = no insulinitis, 1 = peri-insular inflammation, 2 = infiltration < 25%, 3 = infiltration 25–75%, 4 = infiltration > 75%) from non-diabetic male and female ( $n = 3$  per group) NOD mice. Unpaired Student’s *t*-test was used for statistical analysis, \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ .

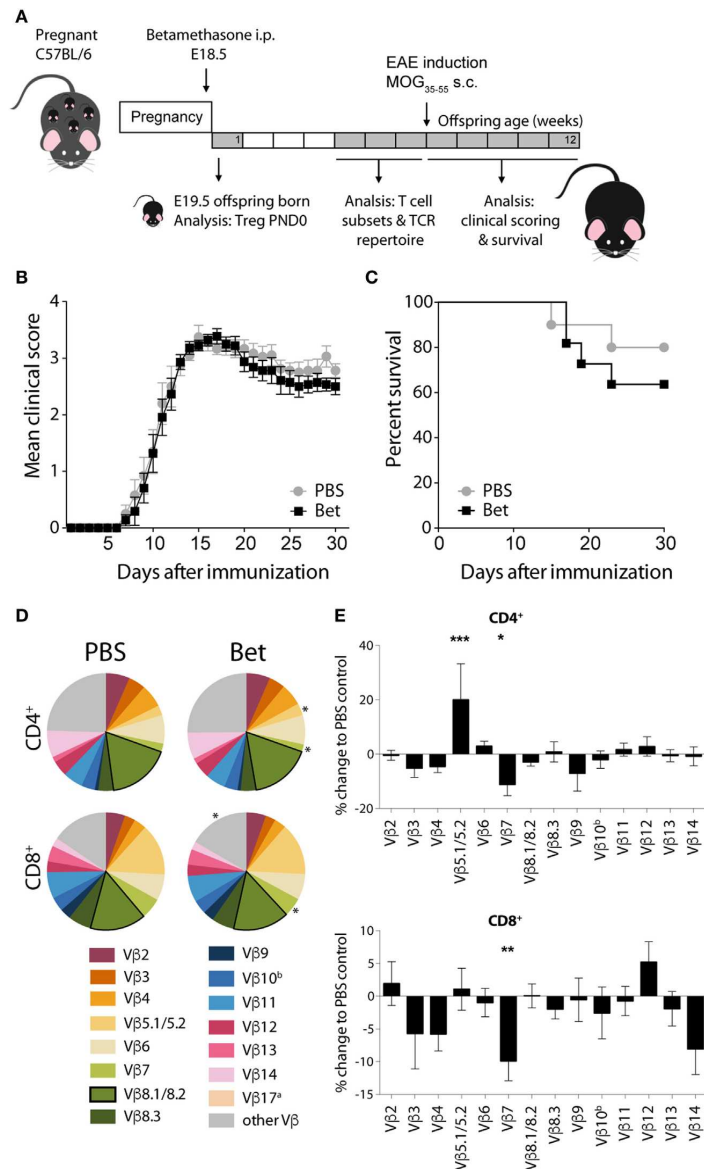


the Treg cell subset the one increasing, we performed RT-PCR on the cultured cells and found increased Foxp3 expression at higher betamethasone concentration (Figure 4C). We obtained similar results when thymocytes derived from untreated Foxp3<sup>REP</sup> reporter mice were treated with betamethasone and Foxp3 expression could be monitored by flow cytometry (Figure S3 in Supplementary Material). To test the effects of glucocorticoids on the frequency of Treg cells *in vivo*, we treated 6 weeks old mice i.p. with 0.1 mg betamethasone. Analysis of the thymus 24 h post-treatment revealed a net increase in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> in the surviving cells (Figure 4D). Finally, to find out if prenatal betamethasone exposure has an effect on the frequency of neonatal Treg cells, we treated pregnant females and analyzed Treg precursor cells in the DP thymocytes and in the CD4SP subpopulations in the offspring at postnatal day 0. As shown in Figure 4E, we could detect an increased frequency of DP CD25<sup>+</sup> Treg precursor cells and a slightly elevated proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> thymic-derived Treg cells 24 h post-treatment (Figure 4F). This neonatal bias, however, did not persist until adulthood, since the percentage of Treg cells in the spleen of animals at 5–7 weeks of age was similar in both groups (Figure 4G). Moreover, no differences were observed in the expression of neuropilin-1 (Figure 4H) or CD62L (not shown), indicating similar percentages of thymic and peripherally induced Treg cells (44), and similar levels of activation in both groups. Proliferation and inflammatory cytokine production of spleen T cells at this age was also comparable in both groups (not shown). Our data demonstrate that Treg

thymocyte precursor cells are less sensitive than conventional CD4<sup>+</sup> precursors to prenatal administration of betamethasone, resulting in a transient increase in the frequency of Treg precursor cells after birth. However, these differences are not persisting, and do not elicit changes in the future Treg cell compartment.

## Prenatal Betamethasone Has No Effect on Disease in the Context of a Highly Restricted Pathogenic Repertoire

In the two models of autoimmune disease that we have analyzed, disease develops spontaneously, and the TCR repertoire of the pathogenic cells is oligoclonal. In both cases, we have shown that antenatal betamethasone treatment elicits changes in the TCR V $\beta$  usage affecting the autoreactive T cell repertoire. To address if indeed glucocorticoid-induced changes in the TCR repertoire are responsible for this effect, we took advantage of a model in which only few TCRs are engaged in the pathogenic response, namely EAE induced by MOG<sub>35–55</sub> peptide. In contrast to the more polyclonal response in the lupus-prone MRL/lpr mouse and in the NOD mouse model, in this induced model of autoimmunity, half of the CNS infiltrating cells bear V $\beta$ 8.1 or V $\beta$ 8.2 (45–47). We therefore treated pregnant C57BL/6J females with betamethasone at E18.5, and let the offspring develop normally, until injection of the MOG peptide at 6 weeks of age (Figure 5A). After disease induction, mice were examined daily and scored for clinical symptoms of disease for 30 days.



**FIGURE 5** | Prenatal betamethasone does not alter the onset or the course of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) despite changes in the T cell receptor (TCR) V $\beta$  repertoire. **(A)** Schematic representation of the EAE mouse model. **(B)** EAE clinical scores and **(C)** survival of C57BL/6J mice ( $n = 9-11$  per group, male and female) after MOG<sub>35-55</sub> EAE induction in offspring of dams prenatally treated with betamethasone or PBS. Statistical analysis of survival was performed with Mantel-Cox test. **(D)** Comparison of V $\beta$  chain usage between C57BL/6J offspring from betamethasone- or sham-treated mothers. Each TCR V $\beta$  chain among CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> splenocytes is represented by a segment proportional in size to its frequency (which on average cover between 74 and 84% of all cells within the T cell subsets, the segment "other V $\beta$ " indicates V $\beta$  chain expression not covered by our panel of TCR V $\beta$  chain-specific Abs). Segments marked with a star differ statistically significant between the groups (PBS or Bet), framed segments indicate TCR V $\beta$  chains important for autoimmune disease in EAE mice. Data obtained at 5-7 weeks ( $n = 15$  per group, male and female). **(E)** TCR V $\beta$  chain usage represented as percent of change to negative control (PBS)  $\pm$  SEM. *N*-way ANOVA was used for statistical analysis of TCR V $\beta$  chain usage, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ .

No differences could be seen in disease onset, clinical score or survival between the animals whose mothers had been treated with betamethasone or with vehicle (**Figures 5B,C**). Analysis of the TCR repertoire revealed significant changes in V $\beta$  chain usage between the two groups, namely affecting V $\beta$ 5.1/5.2 (2.73 vs. 3.27%,  $P = 0.0004$ ) and V $\beta$ 7 (2.24 vs. 1.99%,  $P = 0.0315$ ) in CD4 $^{+}$  and V $\beta$ 7 (5.79 vs. 5.22%,  $P = 0.0040$ ) in CD8 $^{+}$  T cells. However, the frequency of the disease-relevant V $\beta$ 8.1/8.2 chains remained unchanged (**Figures 5D,E**; Table S4 in Supplementary Material). Our data show that prenatal betamethasone is not altering the highly restricted pathogenic TCR repertoire in EAE, and—consequently—the disease course is similar in both groups of mice.

## DISCUSSION

Glucocorticoids are administered to pregnant women at risk of preterm delivery. A single course of betamethasone reduces morbidity related to acute respiratory distress in the neonate, without apparent short-term side effects (6). However, a complete absence of a thymic shadow in X-ray images has been reported for all newborns that received prenatal dexamethasone treatment, while in the majority of healthy gestation-week matched untreated controls the thymus was visible (48). This condition is transient, since control X-rays over the first 4 weeks of life showed a progressive enlargement of the thymic gland (48). To explore possible long-term consequences of prenatal glucocorticoids in humans is a challenge, since women are treated upon symptoms of pre-term birth, which may happen at different time points of pregnancy, and the time span between treatment and birth can also be highly variable. It is therefore not surprising that analysis of cord blood parameters has not yielded conclusive results [reviewed in Ref. (49)]. Interestingly, epidemiological studies in much larger cohorts indicate an increased risk for infection in the neonate (50), and for asthma (51) and T1D (52) in young children that received prenatal steroid treatment.

For the reasons mentioned above in relation to human studies, we decided to use mouse models to explore possible long-term consequences of prenatal steroids upon the immune system. One dose of betamethasone equivalent to what is given in human pregnancy was injected to the dams before delivery. This dose is the minimum dose that showed improved lung maturation compared to vehicle in mice (53). Our experiments showed a drastic reduction in thymic size and cell numbers after prenatal betamethasone in the three mouse strains tested. The thymus plays an essential role for the development of a functional and self-tolerant TCR repertoire. Positive and negative selection events based on TCR avidity for self-pMHC, ensure the elimination of non-functional or autoreactive T cells. Glucocorticoids have been shown to regulate the avidity threshold between positive and negative selection, and altered glucocorticoid signaling results in a biased T cell repertoire (26–28, 54, 55). Thus, it is plausible that an excess of glucocorticoids in a moment of active immune development, like the perinatal period, causes changes in the T cell repertoire influencing development of autoimmunity.

Autoreactive T cell clones bearing distinct TCR V $\beta$  chains expand in the target organs of autoimmune disease. For instance, T cells of the V $\beta$ 8.2 family recognizing MOG<sub>35–55</sub> are predominant in the brain of C57BL/6 mice (47), and the repertoire of T cells infiltrating the pancreas of the NOD mouse is skewed to a limited set of families, including V $\beta$ 2, V $\beta$ 4, V $\beta$ 6, V $\beta$ 8.1, and V $\beta$ 12 (37–41, 56). Interestingly, injection of dexamethasone in the first 3 days of life has been shown to exert long-lasting effects on the expression of several V $\beta$  genes in rats (57). We thus sought to assess the effect of prenatal corticosteroid treatment on the TCR V $\beta$  repertoire in two spontaneous mouse models of autoimmunity. We decided to use flow cytometry to assess TCR V $\beta$  family usage because it allows efficient measurement on the different T cell subsets in individual mice simultaneously, without previous cell sorting. Exploiting this strategy, we observed that V $\beta$  chains that are relevant for the development of T1D in the NOD mouse are underrepresented in the offspring of mothers that were treated with betamethasone. For instance, we found decreased frequencies of peripheral T cells bearing the V $\beta$ 4 in mice whose mothers received betamethasone. V $\beta$ 4 is utilized by all NOD mice in response to a dominant epitope on glutamic acid decarboxylase 65, and T cell responses to this antigen are already detected in the spleens of young pre-diabetic NOD mice (37), suggesting that this is an important epitope of the primary response. The oligoclonal pattern of islet infiltrating T cells in the NOD model in pre-diabetic mice (40, 41) is a strong indication of local antigen-driven expansion of a limited number of clonotypes, at least at the start of the disease, before epitope spreading. Thus, even subtle changes in the composition of the TCR repertoire, if affecting the relevant specificities, are likely to influence disease development. Not surprisingly, disease severity remained unchanged after prenatal betamethasone treatment in MOG-induced EAE, where T cells from the TCR V $\beta$ 8.1/8.2 families, which account for half of the cells infiltrating the central nervous system (46), were not affected by prenatal steroid treatment.

In contrast to the NOD model, we found that V $\beta$  chains known to be expanded in the lymph nodes of MRL/lpr mice are more prominent in the offspring of betamethasone-treated mothers. In this particular mouse strain, the defect in *Fas<sup>pr</sup>* gene promotes the accumulation of activated autoreactive cells with the CD3 $^{+}$ CD4 $^{-}$ CD8 $^{-}$  DN phenotype in peripheral lymphoid organs (33, 58). The expanded population of the abnormally proliferating lymph node T cells in MRL/lpr mice is heterogeneous, but V $\beta$  gene expression is skewed toward members of the V $\beta$ 2 and V $\beta$ 8 families in the DN population (35, 36, 59, 60). The pathogenic nature of V $\beta$ 8-bearing T cells is underpinned by the lack of disease in animals that have been treated with anti-TCR V $\beta$ 8 antibodies (61). Our data show that V $\beta$ 2, V $\beta$ 8.1/8.2 and V $\beta$ 10 $^{b}$  are overrepresented in the DN population in the offspring of betamethasone-treated mothers, indicating a larger contingent of autoreactive cells in these animals. This is further supported by the higher proliferation of CD4 $^{+}$  and CD8 $^{+}$  T cells in the AMLR, and the larger size of lymphoid organs. Still, we did not observe more severe disease in the treated animals, which is probably due to the fact that although autoreactive T cells contribute to the initiation of disease, the underlying causes for the pathogenesis



in the MRL/lpr lupus model lie in the activation of complement by immune complex deposition in the kidney and blood vessels, and inflammatory responses triggered by defects in the clearance of dying cells (62, 63).

How do prenatal glucocorticoids exert their effect on the T cell repertoire? Using different strategies of glucocorticoid-receptor deficiency it has already been shown that diminished glucocorticoid signaling can alter the positive and negative selection avidity thresholds, or create “holes” in the TCR repertoire (26–28). Indeed, lymph nodes and spleen were smaller and the TCR repertoire was less autoreactive in MRL/lpr animals with deficient glucocorticoid receptor expression in thymocytes (26), which is the opposite effect of what we have observed after prenatal excess of glucocorticoids. Mechanistically, this could be due to the ability of glucocorticoids to regulate T cell activation-related processes, thus influencing the outcome of thymic selection. Another possibility is that glucocorticoids alter the TCR repertoire by modulating the transcription of endogenous retroviruses encoding for superantigens (64). Steroid hormones stimulate the expression of HERV-K in human cell lines (65), and a recent study has shown that all endogenous retroviral promoters tested responded to dexamethasone treatment with changes in activity in more than 20 mouse strains (66). Since in the process of developing tolerance to superantigens the TCR-reactive V $\beta$  chains are partially or completely deleted in the thymus (67), glucocorticoid-induced changes in the transcription of endogenous retroviruses could be the underlying cause for the differences that we find in the peripheral TCR repertoire. Indeed, endogenous retroviral sequences induced autoreactive T cells when injected into neonate NOD, but not C57BL/6 mice (68), highlighting the importance of this pathway for the modulation of the T cell repertoire, but also the strain-specific effects (66, 69). In humans, reactivation of endogenous retroviruses has been associated to several autoimmune diseases, including T1D, multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus [reviewed in Ref. (70)]. For instance, viral particles of the human endogenous retrovirus HERV-K have been isolated from pancreatic islets of T1D patients, suggesting a possible role in the disease (71). HERV-K encodes for a superantigen that can efficiently stimulate V $\beta$ 7 CD4<sup>+</sup> T cells, which are expanded in the pancreas of patients with T1D (72, 73). Notably, TCR V $\beta$ 7 CD4<sup>+</sup> precursors were deleted by HERV-K18 in an *in vitro* model of human negative selection (74), altogether linking glucocorticoid-induced transcription of endogenous retroviruses, TCR V $\beta$  repertoire selection and autoimmunity also in the human system.

The observed disease protection in the NOD model is intriguing. Obviously, prenatal exposure to glucocorticoids can alter the epigenome of the offspring, affecting multiple organs and pathways (75). Therefore, in addition to the observed effects on TCR repertoire, we cannot discard epigenetic effects on glucose metabolism or pancreatic beta cell development as disease modifiers (76), and research on this topic is ongoing. Moreover, changes in the microbiome are likely to influence immune system development in the offspring (77). In this context, prenatal dexamethasone was found to induce epigenetic changes affecting genes involved in intestinal barrier function, subsequently influencing bacterial colonization at two weeks after birth (78). Interestingly, changes in the intestinal microbiota or a diet rich in the microbial metabolites acetate and

butyrate have a profound influence on the development of T1D in the NOD mouse by decreasing the frequency of autoreactive T cells or boosting regulatory function (79, 80).

Foxp3<sup>+</sup> Treg cells constitute another plausible player in disease protection. Naturally occurring Treg cells develop in the thymus, originating from thymocytes with high affinity for self pMHC complexes (81), and are also subjected to the effects of prenatal glucocorticoids. In line with published data (42), our results obtained from different *in vitro* and *in vivo* settings show that Treg precursor cells are less sensitive to glucocorticoid-induced cell death than their non-Treg cell counterparts, and this has also been shown for mature Treg cells (43). This could be due to several reasons, including an enhancer effect of glucocorticoid signaling on *foxp3* gene expression (82, 83), or Treg cell generation driven by intrathymic TGF- $\beta$  production upon thymocyte apoptosis (84). Thus, either by preventing apoptosis of Treg cells or by directly inducing Treg cell differentiation, glucocorticoids support enhanced Treg cell development, noticeable shortly after birth. This effect, however, does not persist into adulthood, since we do not see any difference in Treg cell frequencies or function (not shown). In line with our data, adult GR-deficient animals had normal frequencies of Treg cells in the periphery (28). A particular population of Treg cells generated perinatally are crucial for the maintenance of tolerance to self-antigens, and the presence of these cells prevented insulinitis in the NOD mice (22). We do not favor the notion that the perinatally generated Treg cells are responsible for protection in our model, because if prenatal steroids would specifically enhance development of this highly protective population, their influence would be noticeable not only in the NOD model, but also in the EAE model, which is susceptible to even small variations in the Treg cell compartment (43). Altogether, we conclude that it is the changes in the TCR repertoire and not the effect on Treg cell development what influences disease susceptibility in the NOD model. Interestingly, a recent study showed a beta cell antigen-specific pro-inflammatory T-helper cell signature in 6-month-old children who years later developed T1D, suggesting early T cell priming in the perinatal period (85).

A limitation of our prenatal betamethasone treatment model is that not all fetuses are equally affected by prenatal steroid treatment [Figure 1D (16)]. At the time point PND1, the relative frequencies of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes or of granulocytes in spleen can be taken as a proxy for the amount of betamethasone that the fetus received. At 6 weeks of life, however, it is not possible to identify the animals that were only minimally affected by prenatal steroids, and therefore they are also included in the analysis. In this regard, we believe that the long-term effects of prenatal betamethasone might be more prominent than what our results show, since they include animals that were very little affected, and this will not be the case in human singleton pregnancies. A possibility to overcome this problem in the mouse model could be to inject betamethasone postnatally, however, the influence of the incoming microbiome will probably mask the effects of betamethasone. Finally, while our data clearly demonstrate that changes in the TCR repertoire alter the course of autoimmunity, additional T cell-independent mechanisms influencing the outcome of disease are not ruled out.

In this study, we asked whether prenatal exposure to glucocorticoids influences the development of autoimmunity later in life. By analyzing TCR V $\beta$  usage in two mouse strains that spontaneously develop autoimmunity and in the MOG-EAE model, we provide evidence that prenatal betamethasone treatment, by changing the peripheral T cell repertoire, modifies the autoreactive T cell pool, and this may lead to unpredictable variations in the course of autoimmune disease, depending on which T cell clonotypes are affected. Thus, in spite of the undisputable benefits of prenatal glucocorticoids for infants born prematurely, this treatment may be associated with long-term effects on immunity, and it should be used with caution in cases where the risk of preterm birth is only marginal.

## ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of the Declaration of Helsinki for animal experimental investigation and the Principles of Laboratory Animal Care (NIH pub.85–23 revised 1985). The protocol was approved by the local animal ethics committees (ethical approval 119/13 and 122/12 obtained from the state authority of Hamburg, and DMAH8948 obtained from the Generalitat de Catalunya).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AG, CG, ID, and ET designed the experiments. AG, CG, DP-B, JE, ID, NK, and SK performed experiments and acquired data.

## REFERENCES

1. WHO. *Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2014*. Geneva: WHO (2014).
2. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med* (2015) 278(4):369–95. doi:10.1111/joim.12395
3. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* (2002) 347(12):911–20. doi:10.1056/NEJMra020100
4. Kondrashova A, Seiskari T, Ilonen J, Knip M, Hyoty H. The 'hygiene hypothesis' and the sharp gradient in the incidence of autoimmune and allergic diseases between Russian Karelia and Finland. *APMIS* (2013) 121(6):478–93. doi:10.1111/apm.12023
5. Eriksson JG. Developmental origins of health and disease – from a small body size at birth to epigenetics. *Ann Med* (2016) 48(6):456–67. doi:10.1080/07853890.2016.1193786
6. Roberts D, Dalziel S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev* (2006) (3):CD004454. doi:10.1002/14651858.CD004454.pub2
7. WHO. *Improving Preterm Birth Outcomes. Executive Summary*. Geneva: WHO (2015).
8. Vidaeff AC, Belfort MA, Steer PJ. Antenatal corticosteroids: a time for more careful scrutiny of the indications? *BJOG* (2016) 123(7):1067–9. doi:10.1111/1471-0528.13853
9. Kajantie E, Raivio T, Janne OA, Hovi P, Dunkel L, Andersson S. Circulating glucocorticoid bioactivity in the preterm newborn after antenatal betamethasone treatment. *J Clin Endocrinol Metab* (2004) 89(8):3999–4003. doi:10.1210/jc.2004-0013
10. Alexander N, Rosenlocher F, Dettenborn L, Stalder T, Linke J, Distler W, et al. Impact of antenatal glucocorticoid therapy and risk of preterm delivery on intelligence in term-born children. *J Clin Endocrinol Metab* (2016) 101(2):581–9. doi:10.1210/jc.2015-2453

AG, CG, DP-B, JE, and ID analyzed data and interpreted results. AG and SJ performed statistical analyses. LG conducted data visualization. AG and LG prepared the final figures. H-WM, MF, and MV made intellectual contributions. AG and ET wrote the manuscript. All authors read the manuscript and approved submission.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank S. Huber (Center for Internal Medicine, UKE) for kindly providing Foxp3<sup>mRFP</sup> reporter mice and the UKE Flow Cytometry Core Facility for help in sorting. We further thank Manuela Kolster and Romy Hackbusch for excellent technical help and Sabrina Noster for animal husbandry. We thank Mr. M. Fernandez (Germans Trias I Pujol Research Institute) for technical assistance with flow cytometry.

## FUNDING

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KFO296) and a Promotionsstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01505/full#supplementary-material>.

11. Alexander N, Rosenlocher F, Stalder T, Linke J, Distler W, Morgner J, et al. Impact of antenatal synthetic glucocorticoid exposure on endocrine stress reactivity in term-born children. *J Clin Endocrinol Metab* (2012) 97(10):3538–44. doi:10.1210/jc.2012-1970
12. Whitworth MK. Recent guidance on antenatal corticosteroids in prematurity. *BMJ* (2016) 352:i1655. doi:10.1136/bmj.i1655
13. Davidson C, Monga M, Ellison D, Vidaeff A. Continuation of pregnancy after antenatal corticosteroid administration: opportunity for rescue? *J Reprod Med* (2010) 55(1–2):14–8.
14. Pereira L, Caughey AB. Predicting preterm birth: where do the major challenges lie? *J Perinatol* (2012) 32(7):481–2. doi:10.1038/jp.2012.54
15. Wylie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* (1980) 284(5756):555–6. doi:10.1038/284555a0
16. Diepenbruck I, Much CC, Krumbholz A, Kolster M, Thieme R, Thieme D, et al. Effect of prenatal steroid treatment on the developing immune system. *J Mol Med (Berl)* (2013) 91(11):1293–302. doi:10.1007/s00109-013-1069-2
17. Donskoy E, Goldschneider I. Thymocytopoiesis is maintained by blood-borne precursors throughout postnatal life. A study in parabiotic mice. *J Immunol* (1992) 148(6):1604–12.
18. Penit C, Vasseur F. Cell proliferation and differentiation in the fetal and early postnatal mouse thymus. *J Immunol* (1989) 142(10):3369–77.
19. Kurd N, Robey EA. T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective. *Immunol Rev* (2016) 271(1):114–26. doi:10.1111/imr.12398
20. Hsieh CS, Lee HM, Lio CW. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat Rev Immunol* (2012) 12(3):157–67. doi:10.1038/nri3155
21. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* (1995) 155(3):1151–64.
22. Yang S, Fujikado N, Kolodin D, Benoist C, Mathis D. Immune tolerance. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining

- self-tolerance. *Science* (2015) 348(6234):589–94. doi:10.1126/science.aaa47017
23. Chen Z, Benoist C, Mathis D. How defects in central tolerance impinge on a deficiency in regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102(41):14735–40. doi:10.1073/pnas.0507014102
  24. Vacchio MS, Ashwell JD. Thymus-derived glucocorticoids regulate antigen-specific positive selection. *J Exp Med* (1997) 185(11):2033–8. doi:10.1084/jem.185.11.2033
  25. King LB, Vacchio MS, Dixon K, Hunziker R, Margulies DH, Ashwell JD. A targeted glucocorticoid receptor antisense transgene increases thymocyte apoptosis and alters thymocyte development. *Immunity* (1995) 3(5):647–56. doi:10.1016/1074-7613(95)90135-3
  26. Tolosa E, King LB, Ashwell JD. Thymocyte glucocorticoid resistance alters positive selection and inhibits autoimmunity and lymphoproliferative disease in MRL-lpr/lpr mice. *Immunity* (1998) 8(1):67–76. doi:10.1016/S1074-7613(00)80459-8
  27. Lu FW, Yasutomo K, Goodman GB, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG, Germain RN, et al. Thymocyte resistance to glucocorticoids leads to antigen-specific unresponsiveness due to “holes” in the T cell repertoire. *Immunity* (2000) 12(2):183–92. doi:10.1016/S1074-7613(00)80171-5
  28. Mittelstadt PR, Monteiro JP, Ashwell JD. Thymocyte responsiveness to endogenous glucocorticoids is required for immunological fitness. *J Clin Invest* (2012) 122(7):2384–94. doi:10.1172/JCI63067
  29. Wieggers GJ, Kaufmann M, Tischner D, Villunger A. Shaping the T-cell repertoire: a matter of life and death. *Immunol Cell Biol* (2011) 89(1):33–9. doi:10.1038/icb.2010.127
  30. Wan YY, Flavell RA. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102(14):5126–31. doi:10.1073/pnas.0501701102
  31. Alba A, Puertas MC, Carrillo J, Planas R, Ampudia R, Pastor X, et al. IFN beta accelerates autoimmune type 1 diabetes in nonobese diabetic mice and breaks the tolerance to beta cells in nondiabetic-prone mice. *J Immunol* (2004) 173(11):6667–75. doi:10.4049/jimmunol.173.11.6667
  32. Nose M, Nishihara M, Fujii H. Genetic basis of the complex pathological manifestations of collagen disease: lessons from MRL/lpr and related mouse models. *Int Rev Immunol* (2000) 19(4–5):473–98. doi:10.3109/08830180009055508
  33. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* (1992) 356(6367):314–7. doi:10.1038/356314a0
  34. Mountz JD, Smith TM, Toth KS. Altered expression of self-reactive T cell receptor V beta regions in autoimmune mice. *J Immunol* (1990) 144(6):2159–66.
  35. Singer PA, McEvilly RJ, Noonan DJ, Dixon FJ, Theofilopoulos AN. Clonal diversity and T-cell receptor beta-chain variable gene expression in enlarged lymph nodes of MRL-lpr/lpr lupus mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1986) 83(18):7018–22. doi:10.1073/pnas.83.18.7018
  36. Zhou G, Fujio K, Sadakata A, Okamoto A, Yu R, Yamamoto K. Identification of systemically expanded activated T cell clones in MRL/lpr and NZB/W F1 lupus model mice. *Clin Exp Immunol* (2004) 136(3):448–55. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02473.x
  37. Quinn A, McInerney M, Huffman D, McInerney B, Mayo S, Haskins K, et al. T cells to a dominant epitope of GAD65 express a public CDR3 motif. *Int Immunol* (2006) 18(6):967–79. doi:10.1093/intimm/dxk033
  38. Sarukhan A, Gombert JM, Olivi M, Bach JF, Carnaud C, Garchon HJ. Anchored polymerase chain reaction based analysis of the V beta repertoire in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Eur J Immunol* (1994) 24(8):1750–6. doi:10.1002/eji.1830240805
  39. Diz R, Garland A, Vincent BG, Johnson MC, Spidale N, Wang B, et al. Autoreactive effector/memory CD4+ and CD8+ T cells infiltrating grafted and endogenous islets in diabetic NOD mice exhibit similar T cell receptor usage. *PLoS One* (2012) 7(12):e52054. doi:10.1371/journal.pone.0052054
  40. Marrero I, Hamm DE, Davies JD. High-throughput sequencing of islet-infiltrating memory CD4+ T cells reveals a similar pattern of TCR Vbeta usage in prediabetic and diabetic NOD mice. *PLoS One* (2013) 8(10):e76546. doi:10.1371/journal.pone.0076546
  41. Toivonen R, Arstila TP, Hanninen A. Islet-associated T-cell receptor-beta CDR sequence repertoire in prediabetic NOD mice reveals antigen-driven T-cell expansion and shared usage of Vbeta1/beta TCR chains. *Mol Immunol* (2015) 64(1):127–35. doi:10.1016/j.molimm.2014.11.009
  42. Chen X, Murakami T, Oppenheim JJ, Howard OM. Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death. *Eur J Immunol* (2004) 34(3):859–69. doi:10.1002/eji.200324506
  43. Engler JB, Kursawe N, Solano ME, Patas K, Wehrmann S, Heckmann N, et al. Glucocorticoid receptor in T cells mediates protection from autoimmunity in pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2017) 114(2):E181–90. doi:10.1073/pnas.1617115114
  44. Weiss JM, Bilate AM, Gobert M, Ding Y, Curotto de Lafaille MA, Parkhurst CN, et al. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J Exp Med* (2012) 209(10):1723–42. S1. doi:10.1084/jem.20120914
  45. Liu X, Nguyen P, Liu W, Cheng C, Steeves M, Obenaus JC, et al. T cell receptor CDR3 sequence but not recognition characteristics distinguish autoreactive effector and Foxp3(+) regulatory T cells. *Immunity* (2009) 31(6):909–20. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.023
  46. Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* (1995) 25(7):1951–9. doi:10.1002/eji.1830250723
  47. Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A. Delineation of the minimal encephalitogenic epitope within the immunodominant region of myelin oligodendrocyte glycoprotein: diverse V beta gene usage by T cells recognizing the core epitope encephalitogenic for T cell receptor V beta b and T cell receptor V beta 1 H-2b mice. *Eur J Immunol* (1996) 26(10):2470–9. doi:10.1002/eji.1830261030
  48. Michie CA, Hasson N, Tulloh R. The neonatal thymus and antenatal steroids. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* (1998) 79(2):F159. doi:10.1136/fn.79.2.F159a
  49. Solano ME, Holmes MC, Mittelstadt PR, Chapman KE, Tolosa E. Antenatal endogenous and exogenous glucocorticoids and their impact on immune ontogeny and long-term immunity. *Semin Immunopathol* (2016) 38(6):739–63. doi:10.1007/s00281-016-0575-z
  50. Vermillion ST, Soper DE, Newman RB. Neonatal sepsis and death after multiple courses of antenatal betamethasone therapy. *Am J Obstet Gynecol* (2000) 183(4):810–4. doi:10.1067/mob.2000.108838
  51. Pole JD, Mustard CA, To T, Beyene J, Allen AC. Antenatal steroid therapy for fetal lung maturation: is there an association with childhood asthma? *J Asthma* (2009) 46(1):47–52. doi:10.1080/02770900802262795
  52. Greene NH, Pedersen LH, Liu S, Olsen J. Prenatal prescription corticosteroids and offspring diabetes: a national cohort study. *Int J Epidemiol* (2013) 42(1):186–93. doi:10.1093/ije/dys228
  53. Stewart JD, Sienko AE, Gonzalez CL, Christensen HD, Rayburn WF. Placebo-controlled comparison between a single dose and a multidose of betamethasone in accelerating lung maturation of mice offspring. *Am J Obstet Gynecol* (1998) 179(5):1241–7. doi:10.1016/S0002-9378(98)70140-1
  54. Stephens GL, Ashwell JD, Ignatowicz L. Mutually antagonistic signals regulate selection of the T cell repertoire. *Int Immunol* (2003) 15(5):623–32. doi:10.1093/intimm/dxg060
  55. van den Brandt J, Luder F, McPherson KG, de Graaf KL, Tischner D, Wiehr S, et al. Enhanced glucocorticoid receptor signaling in T cells impacts thymocyte apoptosis and adaptive immune responses. *Am J Pathol* (2007) 170(3):1041–53. doi:10.2353/ajpath.2007.060804
  56. Marrero I, Aguilera C, Hamm DE, Quinn A, Kumar V. High-throughput sequencing reveals restricted TCR Vbeta usage and public TCRbeta clonotypes among pancreatic lymph node memory CD4(+) T cells and their involvement in autoimmune diabetes. *Mol Immunol* (2016) 74:82–95. doi:10.1016/j.molimm.2016.04.013
  57. Bakker JM, Kavelaars A, Kamphuis PJ, Zijlstra J, van Bel F, Heijnen CJ. Neonatal dexamethasone treatment induces long-lasting changes in T-cell receptor Vbeta repertoire in rats. *J Neuroimmunol* (2001) 112(1–2):47–54. doi:10.1016/S0165-5728(00)00406-9
  58. Martina MN, Noel S, Saxena A, Rabb H, Hamad AR. Double negative (DN) alphabeta T cells: misperception and overdue recognition. *Immunol Cell Biol* (2015) 93(3):305–10. doi:10.1038/icb.2014.99


59. Herron LR, Eisenberg RA, Roper E, Kakkanaiah VN, Cohen PL, Kotzin BL. Selection of the T cell receptor repertoire in lpr mice. *J Immunol* (1993) 151(7):3450–9.
60. Maldonado MA, Kakkanaiah V, MacDonald GC, Chen F, Reap EA, Balish E, et al. The role of environmental antigens in the spontaneous development of autoimmunity in MRL-lpr mice. *J Immunol* (1999) 162(11):6322–30.
61. De Alboran IM, Gutierrez JC, Gonzalo JA, Andreu JL, Marcos MA, Kroemer G, et al. lpr T cells vaccinate against lupus in MRL/lpr mice. *Eur J Immunol* (1992) 22(4):1089–93. doi:10.1002/eji.1830220432
62. Monteith AJ, Kang S, Scott E, Hillman K, Rajfur Z, Jacobson K, et al. Defects in lysosomal maturation facilitate the activation of innate sensors in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2016) 113(15):E2142–51. doi:10.1073/pnas.1513943113
63. Potter PK, Cortes-Hernandez J, Quartier P, Botto M, Walport MJ. Lupus-prone mice have an abnormal response to thioglycolate and an impaired clearance of apoptotic cells. *J Immunol* (2003) 170(6):3223–32. doi:10.4049/jimmunol.170.6.3223
64. Manghera M, Douville RN. Endogenous retrovirus-K promoter: a landing strip for inflammatory transcription factors? *Retirovirology* (2013) 10:16. doi:10.1186/1742-4690-10-16
65. Ono M, Kawakami M, Ushikubo H. Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D. *J Virol* (1987) 61(6):2059–62.
66. Hsu K, Lee YK, Chew A, Chiu S, Lim D, Greenhalgh DG, et al. Inherently variable responses to glucocorticoid stress among endogenous retroviruses isolated from 23 mouse strains. *Biochim Biophys Acta* (2017) 1863(10 Pt B):2594–600. doi:10.1016/j.bbdis.2016.10.026
67. Blackman MA, Burgert HG, Woodland DL, Palmer E, Kappler JW, Marrack P. A role for clonal inactivation in T cell tolerance to Mls-1a. *Nature* (1990) 345(6275):540–2. doi:10.1038/345540a0
68. Bashratyan R, Regn D, Rahman MJ, Marquardt K, Fink E, Hu WY, et al. Type 1 diabetes pathogenesis is modulated by spontaneous autoimmune responses to endogenous retrovirus antigens in NOD mice. *Eur J Immunol* (2017) 47(3):575–84. doi:10.1002/eji.201646755
69. Das MR, Cohen A, Zamvil SS, Offner H, Kuchroo VK. Prior exposure to superantigen can inhibit or exacerbate autoimmune encephalomyelitis: T-cell repertoire engaged by the autoantigen determines clinical outcome. *J Neuroimmunol* (1996) 71(1–2):3–10. doi:10.1016/S0165-5728(96)00107-5
70. Balada E, Vilardell-Tarres M, Ordi-Ros J. Implication of human endogenous retroviruses in the development of autoimmune diseases. *Int Rev Immunol* (2010) 29(4):351–70. doi:10.3109/08830185.2010.485333
71. Conrad B, Weissmahr RN, Boni J, Arcari R, Schubach J, Mach B. A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type 1 diabetes. *Cell* (1997) 90(2):303–13. doi:10.1016/S0092-8674(00)80338-4
72. Codina-Busqueta E, Scholz E, Munoz-Torres PM, Roura-Mir C, Costa M, Xufre C, et al. TCR bias of in vivo expanded T cells in pancreatic islets and spleen at the onset in human type 1 diabetes. *J Immunol* (2011) 186(6):3787–97. doi:10.4049/jimmunol.1002423
73. Conrad B, Weidmann E, Trucco G, Rudert WA, Behboo R, Ricordi C, et al. Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology. *Nature* (1994) 371(6495):351–5. doi:10.1038/371351a0
74. Meylan F, De Smedt M, Leclercq G, Plum J, Leupin O, Marguerat S, et al. Negative thymocyte selection to HERV-K18 superantigens in humans. *Blood* (2005) 105(11):4377–82. doi:10.1182/blood-2004-07-2596
75. Crudo A, Petropoulos S, Suderman M, Moisiadis VG, Kostaki A, Hallett M, et al. Effects of antenatal synthetic glucocorticoid on glucocorticoid receptor binding, DNA methylation, and genome-wide mRNA levels in the fetal male hippocampus. *Endocrinology* (2013) 154(11):4170–81. doi:10.1210/en.2013-1484
76. Sun Y, Wan X, Ouyang J, Xie R, Wang X, Chen P. Prenatal dexamethasone exposure increases the susceptibility to autoimmunity in offspring rats by epigenetic programming of glucocorticoid receptor. *Biomed Res Int* (2016) 2016:9409452. doi:10.1155/2016/9409452
77. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* (2014) 157(1):121–41. doi:10.1016/j.cell.2014.03.011
78. Cortese R, Lu L, Yu Y, Ruden D, Claud EC. Epigenome-microbiome crosstalk: a potential new paradigm influencing neonatal susceptibility to disease. *Epigenetics* (2016) 11(3):205–15. doi:10.1080/15592294.2016.1155011
79. King C, Sarvetnick N. The incidence of type-1 diabetes in NOD mice is modulated by restricted flora not germ-free conditions. *PLoS One* (2011) 6(2):e17049. doi:10.1371/journal.pone.0017049
80. Marino E, Richards JL, McLeod KH, Stanley D, Yap YA, Knight J, et al. Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes. *Nat Immunol* (2017) 18(5):552–62. doi:10.1038/ni.3713
81. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* (2001) 2(4):301–6. doi:10.1038/86302
82. Rudra D, deRoos P, Chaudhry A, Niec RE, Arvey A, Samstein RM, et al. Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nat Immunol* (2012) 13(10):1010–9. doi:10.1038/ni.2402
83. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Ruckert B, et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* (2004) 114(6):1425–33. doi:10.1016/j.jaci.2004.07.014
84. Konkel JE, Jin W, Abbatiello B, Grainger JR, Chen W. Thymocyte apoptosis drives the intrathymic generation of regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111(4):E465–73. doi:10.1073/pnas.1320319111
85. Heninger AK, Eugster A, Kuehn D, Buettner F, Kuhn M, Lindner A, et al. A divergent population of autoantigen-responsive CD4+ T cells in infants prior to beta cell autoimmunity. *Sci Transl Med* (2017) 9(378). doi:10.1126/scitranslmed.aaf8848

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Gieras, Gehbauer, Perna-Barrull, Engler, Diepenbruck, Glau, Joosse, Kersten, Klinge, Mittrücker, Friese, Vives-Pi and Tolosa. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.




# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Prenatal Betamethasone interferes with immune system development and alters target cells in autoimmune diabetes

David Perna-Barrull<sup>1</sup>, Silvia Rodríguez-Fernández<sup>2</sup>, Irma Pujol-Autonell<sup>1</sup>, Anna Gieras<sup>2</sup>, Rosa M. Ampudia-Carrasco<sup>1</sup>, Adrian Villalba<sup>1</sup>, Laura Glau<sup>2</sup>, Eva Tolosa<sup>2</sup> & Marta Vives-Pi<sup>1,3</sup> 

Non-genetic factors are crucial in the pathogenesis of type 1 diabetes (T1D), a disease caused by autoimmunity against insulin-producing  $\beta$ -cells. Exposure to medications in the prenatal period may influence the immune system maturation, thus altering self-tolerance. Prenatal administration of betamethasone—a synthetic glucocorticoid given to women at risk of preterm delivery—may affect the development of T1D. It has been previously demonstrated that prenatal betamethasone administration protects offspring from T1D development in nonobese diabetic (NOD) mice. The direct effect of betamethasone on the immature and mature immune system of NOD mice and on target  $\beta$ -cells is analysed in this paper. *In vitro*, betamethasone decreased lymphocyte viability and induced maturation-resistant dendritic cells, which in turn impaired  $\gamma\delta$  T cell proliferation and decreased IL-17 production. Prenatal betamethasone exposure caused thymus hypotrophy in newborn mice as well as alterations in immune cells subsets. Furthermore, betamethasone decreased  $\beta$ -cell growth, reduced C-peptide secretion and altered the expression of genes related to autoimmunity, metabolism and islet mass in T1D target tissue. These results support the protection against T1D in the betamethasone-treated offspring and demonstrate that this drug alters the developing immune system and  $\beta$ -cells. Understanding how betamethasone generates self-tolerance could have potential clinical relevance in T1D.

Type 1 diabetes mellitus (T1D) is a metabolic disease caused by the destruction of pancreatic  $\beta$ -cells by autoreactive T lymphocytes<sup>1</sup>. T1D is usually diagnosed during childhood or adolescence, and its incidence is steadily increasing an average of 4% per year<sup>2</sup>. Many autoimmune diseases display a similar increase in incidence, but so far, there is no explanation for this trend. The challenge in finding a cure is based on the heterogeneity of mechanisms that ultimately lead to the development of autoimmune reactions. For this reason, a better understanding of the influence of non-genetic factors in T1D susceptibility is needed.

Predisposition to this disease relies mainly on genetic and environmental factors. Changes in the environment in the last decades have critically contributed to the increase in T1D incidence<sup>3</sup> and other autoimmune diseases. Recently, special attention has been focused on pre- and perinatal factors. An indirect evidence of their contribution in this matter is that dizygotic twins show greater incidence of T1D (15–25%)<sup>4,5</sup> than non-twin siblings (5–10%)<sup>4,6</sup>. The age of the mother is also relevant to the increasing incidence of T1D<sup>7</sup>. Moreover, the greater number of alloreactive microchimeric maternal cells in autoimmune diseases<sup>8</sup> and specifically in the pancreas from patients with T1D can be related to the pathogenesis of the disease<sup>9</sup>. More recently, a preprimed CD4<sup>+</sup> T cell population with capacity to respond immunologically to  $\beta$ -cell antigens was found in newborns, and these cells seem to be generated by an inefficient antigen presentation in the first months of life<sup>10</sup>.

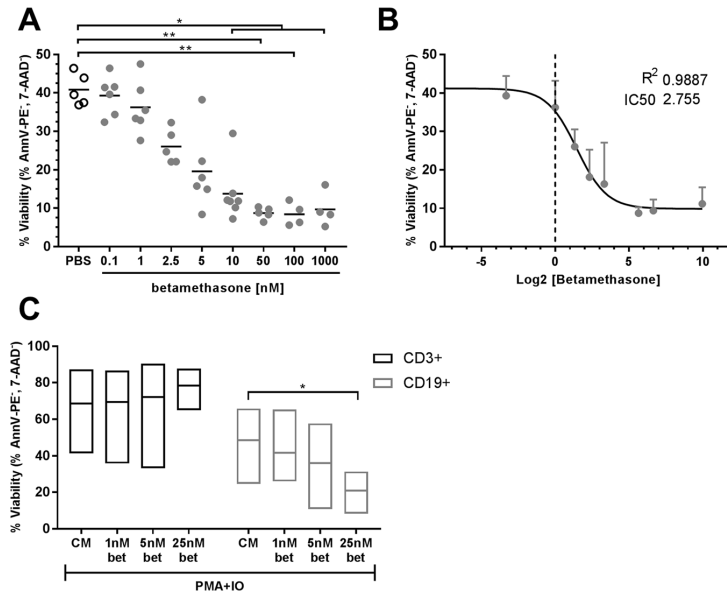
Considering the pivotal relevance of the prenatal time window and how extrinsic factors can determine the development of autoimmunity/T1D in later life, the use of medical interventions during this period can alter the immune response in adult life. In a spontaneous T1D experimental model, the non-obese diabetic (NOD) mouse, we have recently shown that prenatal administration of betamethasone reduced T1D incidence in the offspring

<sup>1</sup>Immunology Section, Germans Trias i Pujol Research Institute, Autonomous University of Barcelona, Badalona, Spain. <sup>2</sup>Department of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. <sup>3</sup>CIBERDEM, Barcelona, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.V.-P. (email: [mvides@igtp.cat](mailto:mvides@igtp.cat))

Received: 11 June 2018

Accepted: 17 December 2018

Published online: 04 February 2019



**Figure 1.** Betamethasone affects splenocytes' viability and proliferation *in vitro*. (A) Percentage of viable splenocytes (annexinV-PE<sup>-</sup>, 7aad<sup>-</sup>) after 24 h of culture with increasing betamethasone concentrations [0.1; 1; 2.5; 5; 10; 50; 100 and 1000 nM] (grey dots), and control condition (white circles). Lines show the mean of  $n \geq 4$  independent experiments ( $*p \leq 0.05$  and  $**p < 0.01$ , Dunn's test, Kruskal-Wallis). (B) Sigmoidal non-linear regression of the splenocytes' viability and the Log<sub>2</sub> of the betamethasone concentration to determine the inhibitory concentration 50 ( $R^2 = 0.9887$  and  $IC_{50} = 2.755$  nM). (C) Percentage of viable T cells (annexinV-PE<sup>-</sup>, 7aad<sup>-</sup> of CD3<sup>+</sup> splenocytes) and B cells (annexinV-PE<sup>-</sup>, 7aad<sup>-</sup> of CD19<sup>+</sup> splenocytes) after 72 h of culture with betamethasone (bet). White bars correspond to T cells with phorbol 12-miristate 13-acetate and ionomycin (PMA + IO) cultured with complete media (CM), 1 nM, 5 nM or 25 nM bet. Grey bars correspond to B cells with PMA + IO cultured with CM, 1 nM, 5 nM or 25 nM bet. Results presented as range and mean of 5 independent experiments ( $*p \leq 0.05$ , Tukey's test, Two-Way Anova).

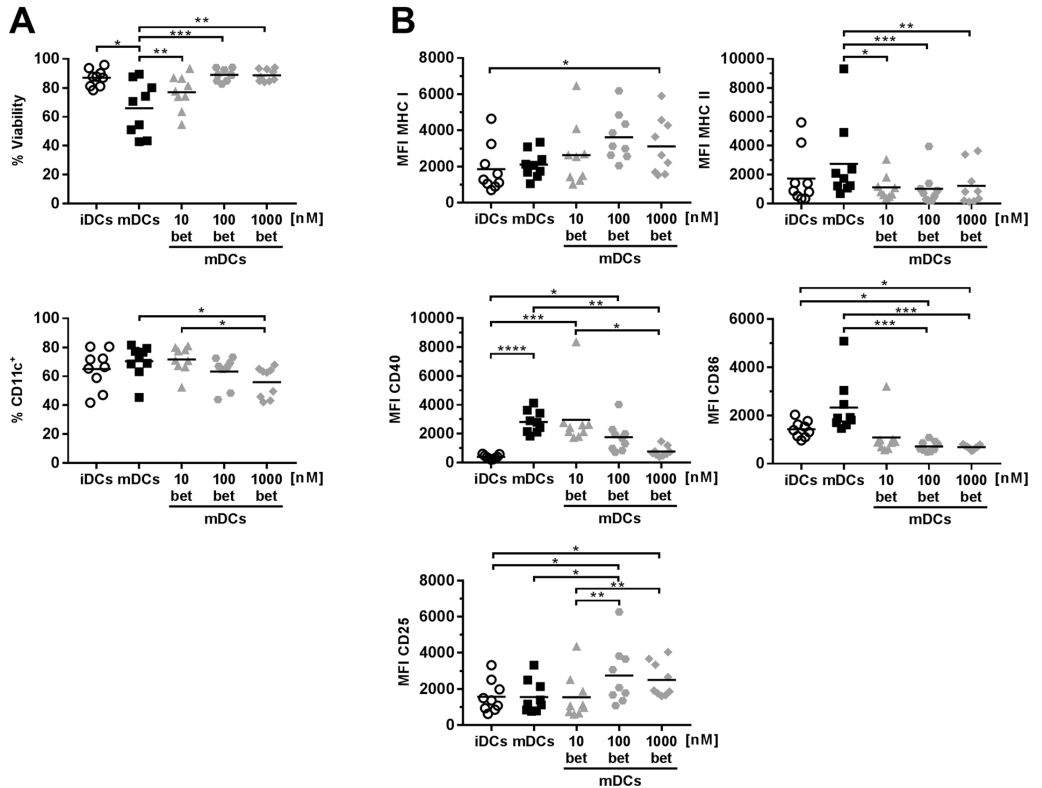
and changed the TCR repertoire<sup>11</sup>. Betamethasone –a synthetic glucocorticoid widely used in obstetrics– induced foetal lung maturation, and significantly reduced mortality and morbidity in preterm newborns<sup>12</sup>. This drug easily reaches the foetus because it is not affected by inactivation by the placental enzyme 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 2<sup>13</sup>. Moreover, betamethasone also targets the ubiquitous glucocorticoid receptor, which is present in almost all cell types, including leukocytes, and may therefore affect the development of the immune system<sup>13</sup>.

One of the effects of betamethasone on T lymphocytes is the alteration of the T cell-receptor (TCR) repertoire. It has been previously demonstrated that prenatal betamethasone treatment results in a biased TCR repertoire, affecting the TCR (V $\beta$ ) relevant for T1D antigen recognition. In this scenario, the lower frequency of pathogenic TCRs (V $\beta$ 12 in CD4<sup>+</sup> T cells and V $\beta$ 6 in CD8<sup>+</sup> T cells) was reflected in the reduced immune cell infiltration in the pancreas and contributed to protection from T1D in the NOD mice<sup>11</sup>. These results encouraged us to analyse in depth the effects of prenatal betamethasone.

The effects of betamethasone on the immune system in NOD mice and in the insulin-producing  $\beta$ -cells, the target cells of T1D, are reported in this study. The results provide an explanation for the reduced incidence of T1D in NOD offspring after prenatal betamethasone treatment, enlightening possible immunological mechanisms, and adding knowledge in the complex puzzle that shapes the development of the immune system.

## Results

**Betamethasone deteriorates splenocytes' viability.** Treatment with betamethasone causes apoptosis of immature thymocytes<sup>11,14</sup>. The direct effect of betamethasone on splenocytes was evaluated in this study. A dose-dependent reduction of splenocytes' viability was observed after 24 h of culture, with a significant decrease starting at 10 nM betamethasone (Fig. 1A), reaching a plateau at 50 nM. Sigmoidal non-linear regression of the toxicity assay showed an inhibitory concentration 50 (IC<sub>50</sub>) of 2.755 nM betamethasone with an adjustment of the sigmoidal regression ( $R^2$ ) of 0.9887 (Fig. 1B). Moreover, after Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) and ionomycin stimulation for 72 h, splenocytes viability was determined (Fig. 1C). No effect was observed in T lymphocytes viability. In contrast, a reduction in the viability of B cells was observed when 25 nM betamethasone was used.



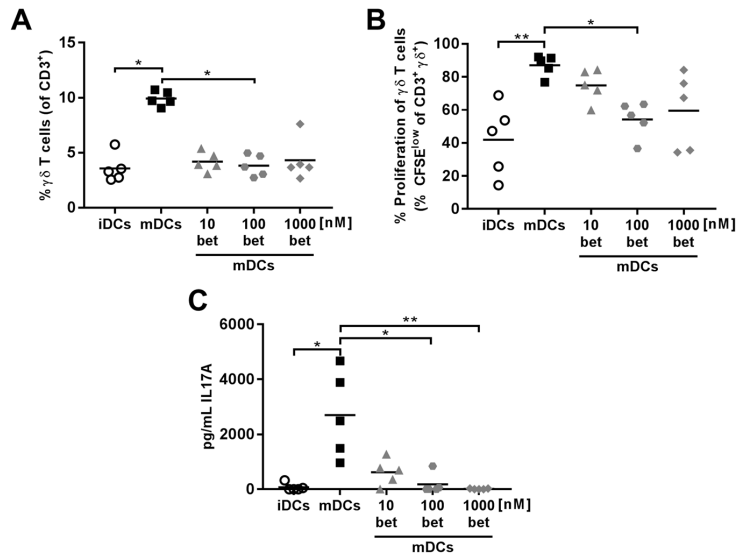
**Figure 2.** Dendritic cells (DCs) derived from bone marrow precursors in the presence of betamethasone show a semi-mature phenotype after LPS stimuli. (A) Upper panel: percentage of viability of DCs (annexinV PE<sup>-</sup>, 7aad<sup>-</sup> of CD11c<sup>hi</sup>). Lower panel: differentiation yield of DCs from bone marrow progenitors (% CD11c<sup>+</sup>). (B) Median of fluorescence intensity (MFI) of MHC class I, MHC class II, CD40, CD86 and CD25 surface expression on DCs (CD11c<sup>+</sup>). White circles represent immature DCs (iDCs) after differentiation. Black and grey symbols represent DCs stimulated with lipopolysaccharide (LPS) for 24 h, without betamethasone (bet) (mDCs, black squares), or with 10 nM bet (grey triangles), 100 nM bet (grey dots), 1000 nM bet (grey rhombus). Lines show the mean of 9 independent experiments (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001, Dunn's test, Friedman test).

To assess if this drug affects human leukocytes viability, we tested the *in vitro* effect of betamethasone in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors. The results show that betamethasone affects leukocyte viability *in vitro* starting at 10<sup>5</sup> nM (Suppl. Fig. 1). The effect was due to the decrease in viability of monocytes (CD14<sup>+</sup>) and B cells (CD19<sup>+</sup>).

In summary, betamethasone has a toxic effect on murine lymphocytes, and in human leukocytes, but at higher concentrations.

**Betamethasone treatment prevents full maturation of dendritic cells (DCs).** Antigen presenting cells are crucial for the outcome of adaptive immune responses, either orchestrating an inflammatory or a tolerogenic response. To assess the effect of betamethasone on DCs maturation, bone marrow precursor cells were cultured with increasing betamethasone concentrations during the differentiation process. The viability and phenotype were assessed after maturation with lipopolysaccharide (LPS). Betamethasone improved DCs viability after LPS maturation in comparison to untreated mature DCs (mDCs) (Fig. 2A, upper panel), but decreased the percentage of CD11c<sup>+</sup> cells (Fig. 2A lower panel). Surface expression of MHC class I, MHC class II, CD40, CD86 and CD25 was determined by flow cytometry (Fig. 2B). Betamethasone treatment did not alter MHC class I expression in mDCs. In contrast, a significant reduction in MHC class II expression was found in all the betamethasone mDCs (betDCs) conditions when compared to mDCs. CD40 expression was downmodulated in the 1000betDCs condition when compared to mDCs, reaching levels of immature DCs (iDCs). Regarding the CD86 expression, a significant downmodulation in 100betDCs and 1000betDCs conditions was also observed. Finally, the expression of CD25 – a marker of immunoregulation<sup>15</sup> – was upregulated in the 100betDCs when compared to mDCs. In summary, these data show that betamethasone prevents full maturation of DCs.





**Figure 3.** Dendritic cells (DCs) differentiated with betamethasone impair autologous  $\gamma\delta^+$  T lymphocyte proliferation. DCs were loaded with insulin (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and cultured with splenocytes in a ratio 1:10 for 4 days. White circles represent immature DCs (iDCs), black squares represent mature DCs (mDCs) generated in basal conditions and stimulated with lipopolysaccharide (LPS), grey symbols represent mDCs with 10 nM (triangles), 100 nM (dots) and 1000 nM (rhombus) betamethasone (bet) during differentiation and stimulated with LPS. (A) Percentage of  $\gamma\delta^+$  T cells within CD3<sup>+</sup> population after co-culture with DCs. (B) Percentage of autologous proliferation of  $\gamma\delta^+$  T cells (% CFSE<sup>low</sup>) after co-culture with DCs. (C) IL-17A production in T cell proliferation experiments measured in supernatants after 4 days of co-culture of DCs and splenocytes. Lines show the mean of 5 independent experiments (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , Dunn's test, Kruskal-Wallis test).

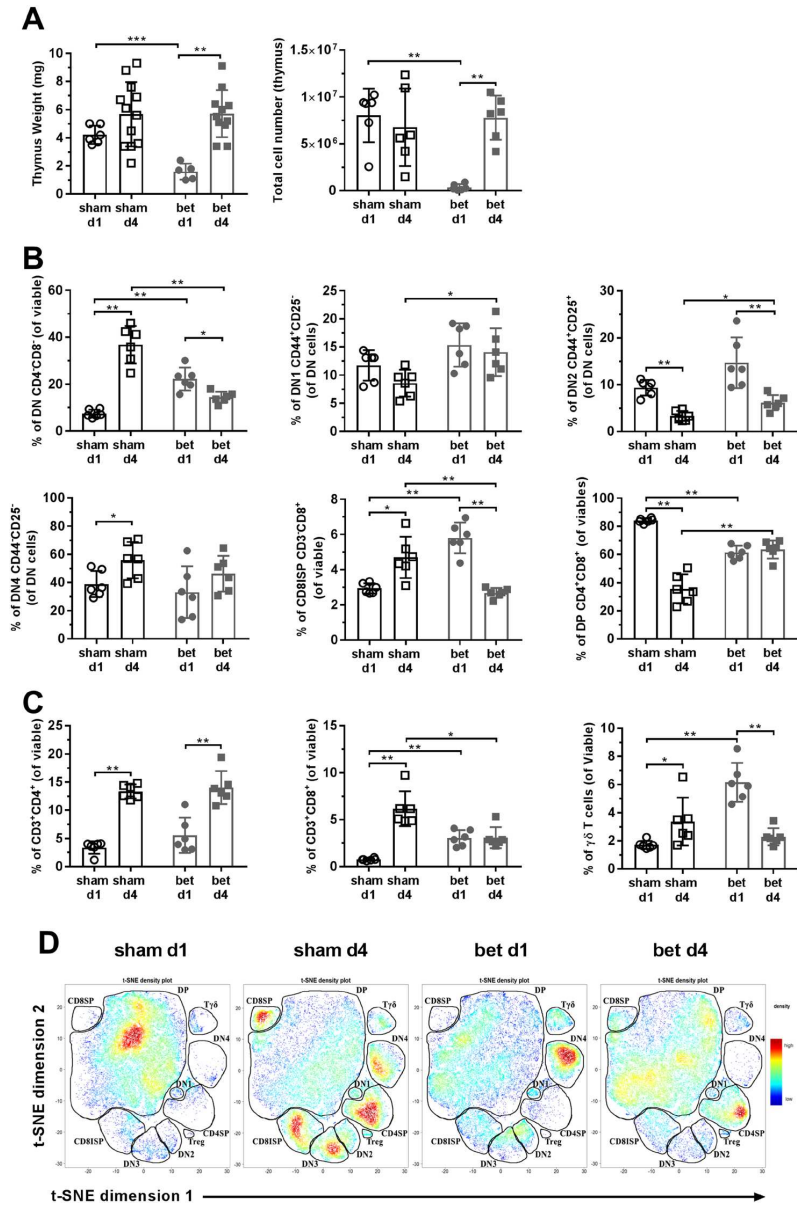
To validate the effect of betamethasone in DCs matured with other innate immune ligands, CpG was used as maturation stimuli. The results show that betamethasone affects similarly both DCs matured with LPS or CpG in terms of viability, yield, and phenotype (Suppl. Fig. 2), and that it still points to a semi-mature or tolerogenic phenotype. Taken together, these results demonstrate that both maturation stimuli are not as powerful in the presence of betamethasone.

### Betamethasone-generated DCs impaired proliferation of $\gamma\delta^+$ T lymphocytes and decreased IL-17 production.

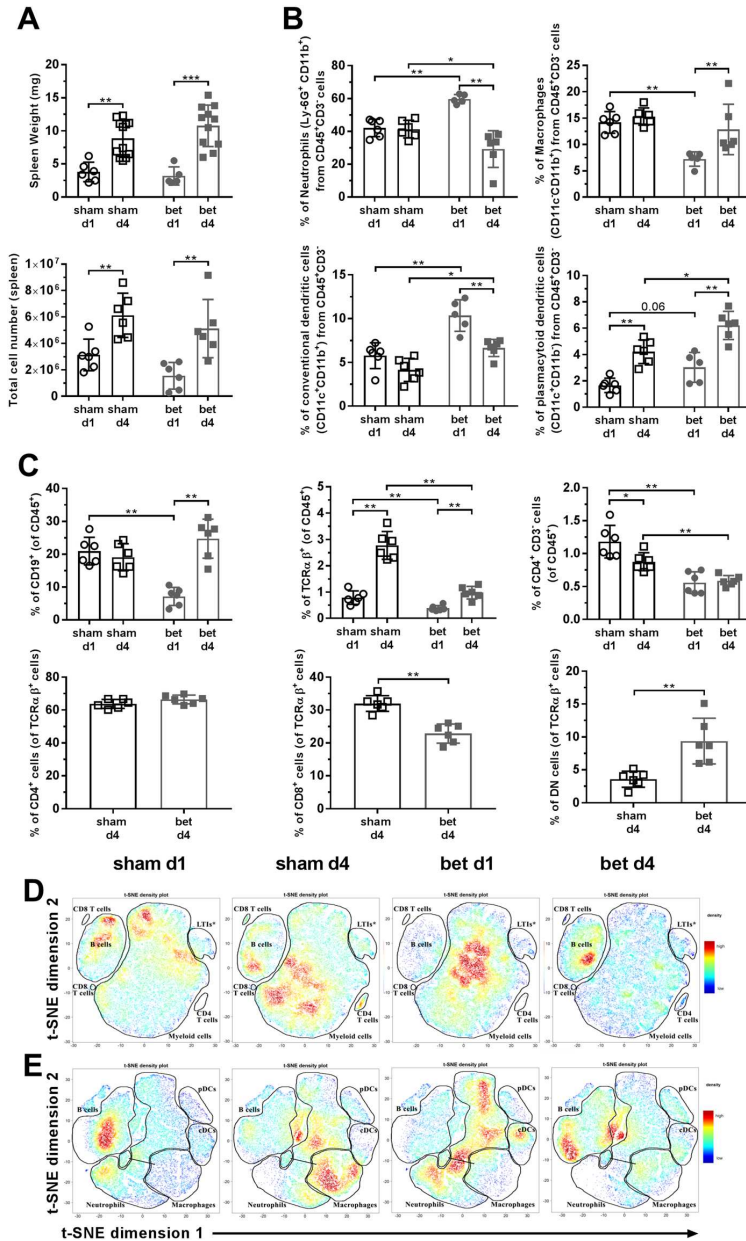
Since betamethasone inhibits DCs maturation, the ability of these DCs to induce lymphocyte proliferation was analysed. To that end, DCs exposed to betamethasone and LPS or CpG were co-cultured with Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) stained splenocytes from NOD mice. Although no differences were found in the percentage of B lymphocytes, the percentage of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes was lower when DCs were exposed to betamethasone (1000betDCs) when compared to mDCs (Suppl. Fig. 3A). No differences were found in T and B lymphocyte proliferation induced by DCs (Suppl. Fig. 3A). Regarding DCs matured with CpG, we observed a similar T cell proliferation pattern in comparison to those matured with LPS (Suppl. Fig. 3B). Surprisingly, the percentage of  $\gamma\delta^+$  double negative (DN) CD3<sup>+</sup> T cells was lower in 100betDCs condition when compared to mDCs condition (Fig. 3A and Suppl. Fig. 3B), even though the same trend was observed at concentrations of 10 and 1000 nM. Moreover, a significant inhibition of  $\gamma\delta^+$  DN CD3<sup>+</sup> T cell proliferation was observed at 100 nM (Fig. 3B), demonstrating the biological effect of betamethasone. The secretion of IL-17 was determined in the supernatant of the co-culture of splenocytes with DCs. The results show a decrease in IL-17 secretion by betamethasone effect in proliferation experiments (Fig. 3C). In summary, proliferation of  $\gamma\delta^+$  T cells, but not of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, is impaired after exposure to DCs generated with betamethasone and this effect is accompanied by a reduction of IL-17.

### Prenatal betamethasone causes thymus hypotrophy and alters the peripheral immune compartment in newborn NOD mice.

To assess the *in vivo* effect of betamethasone in primary and secondary lymphoid organs, the weight of the thymus and spleen after birth, at day 1 (d1) and day 4 (d4), were determined. As expected, the weight of the thymus was lower in the betamethasone treated group when compared to the sham group ( $\Delta_{\text{increase}} = -62.05\%$ ) at d1 (Fig. 4A). At d4, thymus weight was similar in both groups ( $\Delta_{\text{increase}} = 0.76\%$ ), reflecting a recovery, as reported<sup>14</sup>. According to these data, the number of thymocytes obtained after mechanical disruption was significantly lower in the betamethasone group at d1 when compared to the sham group. At d4, the number of thymocytes was similar in both groups.



**Figure 4.** Prenatal betamethasone alters thymocyte maturation in the thymus. **(A)** Weight and total number of cells in the thymus. White symbols represent the control group and grey symbols represent the betamethasone (bet) group, circles or dots and squares were used for postnatal day 1 (d1) and postnatal day 4 (d4) after birth, respectively. Bars and symbols show the mean  $\pm$  s.d. of  $n \geq 5$  mice ( $*p \leq 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ , Mann-Whitney test). **(B)** Percentage of maturing thymocytes in the double negative (DN) stage (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>), DN stage 1 (DN1, CD44<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>), DN stage 2 (DN2, CD44<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>), DN stage 4 (DN4, CD44<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup>) from the DN population, CD8 immature single positive (CD8ISP, CD3<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>) and double positive (DP) stage (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>). White symbols represent the sham group and grey symbols represent the bet group; circles or dots and squares were used for d1 and d4, respectively. Bars and symbols show the mean  $\pm$  s.d. of  $n \geq 5$  mice ( $*p \leq 0.05$ ,  $**p < 0.01$ , Mann-Whitney test). **(C)** Percentage of viable CD4<sup>+</sup> thymocytes, CD8<sup>+</sup> thymocytes and  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> thymocytes. White symbols represent the sham group and grey symbols represent the bet group; circles or dots and squares were used for d1 and d4, respectively. Bars and symbols show the mean  $\pm$  s.d. of  $n \geq 5$  mice ( $*p \leq 0.05$ ,  $**p < 0.01$ , Mann-Whitney test). **(D)** t-SNE representation of the cell abundance (density) for each thymic population analysed by flow cytometry at d1 and d4 after birth in control and bet groups. The plots show two representative animals per group.



**Figure 5.** Immune cell subsets in the spleen are altered after betamethasone treatment. (A) Weight and total number of cells in the spleen. White symbols represent the PBS group and grey symbols represent the betamethasone (bet) group, circles or dots and squares were used for postnatal day 1 (d1) and postnatal day 4 (d4), respectively. Bars and symbols show the mean  $\pm$  s.d. of  $n \geq 5$  mice (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , Mann-Whitney test). (B) Percentage of neutrophils (Ly6G<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>), macrophages (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>), conventional dendritic cells (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>) and plasmacytoid dendritic cells (CD11c<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>) from the CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> population in the spleen. White symbols represent the sham group and grey symbols represent the bet group; circles or dots and squares were used for d1 and d4, respectively. Bars and symbols show the mean  $\pm$  s.d. of  $n \geq 5$  mice (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , Mann-Whitney test). (C) Percentage of viable lymphocytes (CD19<sup>+</sup> B cells and TCRαβ<sup>+</sup> T cells) and viable CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>. Percentages of CD4<sup>+</sup> cells, CD8<sup>+</sup> cells and DN cells from the T cell population are only available at d4. White symbols represent the sham group and grey symbols represent the bet group; circles or dots and squares were used for d1 and d4, respectively. Bars

and symbols show the mean  $\pm$  s.d. of  $n \geq 5$  mice (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , Mann-Whitney test). (D) t-SNE representation of the cell abundance (density) for each spleen lymphoid population analysed by flow cytometry at d1 and d4 after birth in control and bet groups. Asterisk (\*) refers to a population that is probably lymphoid tissue inducer cells (LTIs), but no positive marker in the cytometry panel was used. The plots show two representative animals per group. (E) t-SNE representation of the cell abundance (density) for each spleen myeloid population analysed by flow cytometry at d1 and d4 after birth in control and bet groups. The plots show two representative animals per group.

The effect of betamethasone in the cellular composition of the thymus after birth, at d1 and d4, was then analysed. Regarding thymocyte maturation, the percentages of thymocyte subsets were altered by prenatal betamethasone administration (Fig. 4B). As expected, double positive (DP) thymocytes, the most glucocorticoid-sensitive subset, were significantly reduced at d1 after treatment. This effect, however, was reversed at d4. A compensatory increase in the frequency of DN thymocytes was also observed at d1, but not at d4. Within the DN subpopulations, the first stages (DN1 and DN2) and the CD8 immature single positive (CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD8ISP) were the ones overrepresented in the betamethasone-treated samples at d1, while DN3 and DN4 percentages were maintained. At d4 after birth, the DN subpopulations were similar in treated and non-treated mice, except for the CD8ISP subset, which was significantly reduced in the betamethasone group.

Then, mature thymocytes subsets (single positive, SP) were examined (Fig. 4C). No effect of betamethasone was observed in the CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cell subset. As expected, the percentage of this subset increased at d4 when compared to d1, both in treated and control mice. In contrast, betamethasone hindered the increase in the percentage of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cell subset observed at d4 in the control group. Finally, betamethasone increased the percentage of  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T lymphocytes at d1, recovering normal values at d4. A t-SNE analysis, performed with the data obtained from flow cytometry, show the composition of the thymocyte compartment at d1 and d4 in treated and sham mice (Fig. 4D and Suppl. Fig. 4). The density plots confirm the above mentioned differences (Fig. 4B,C) in the betamethasone group when compared with the control group at both checkpoints.

The weight of the spleen was not affected by betamethasone ( $\Delta_{\text{increase}} = -16.32\%$  at d1 and  $\Delta_{\text{increase}} = 21.5\%$  at d4) (Fig. 5A, upper panel). The cellular composition was also altered after prenatal treatment: neutrophils were markedly increased at d1 after betamethasone treatment (Fig. 5B) while the frequency of macrophages was clearly reduced. Conventional DCs showed higher frequencies at d1 and d4 after treatment, and the frequencies of plasmacytoid DCs tended to the same increase.

Splenic lymphocyte subsets were then analysed (Fig. 5C). A decrease in the percentage of B lymphocytes (CD19<sup>+</sup>) was detected in the betamethasone group at d1 when compared to the sham group, but it subsequently normalised at d4. The TCR $\alpha$ <sup>β</sup><sup>+</sup> T cell subset was reduced in percentage in the treated group at both time points. Likewise, the percentage of putative lymphoid tissue inducer cells (CD4<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>, LTIs) was reduced in the treated group at d1 and d4 when compared to the sham group. Due to the very low amount of T cells in spleen at d1, the T cell compartment was no further differentiated. At d4, no differences were found when comparing the CD4<sup>+</sup> subset between the two groups. CD8<sup>+</sup> cells were significantly decreased, and a compensatory increase in CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> in the betamethasone-treated group was observed. Similarly to the previous thymus analysis, a t-SNE analysis of the spleen was performed, including lymphoid (Fig. 5D and Suppl. Fig. 5) and myeloid (Fig. 5E and Suppl. Fig. 6) population density. A clear shift in the population density was observed in lymphoid and myeloid populations by the effect of betamethasone at both checkpoints.

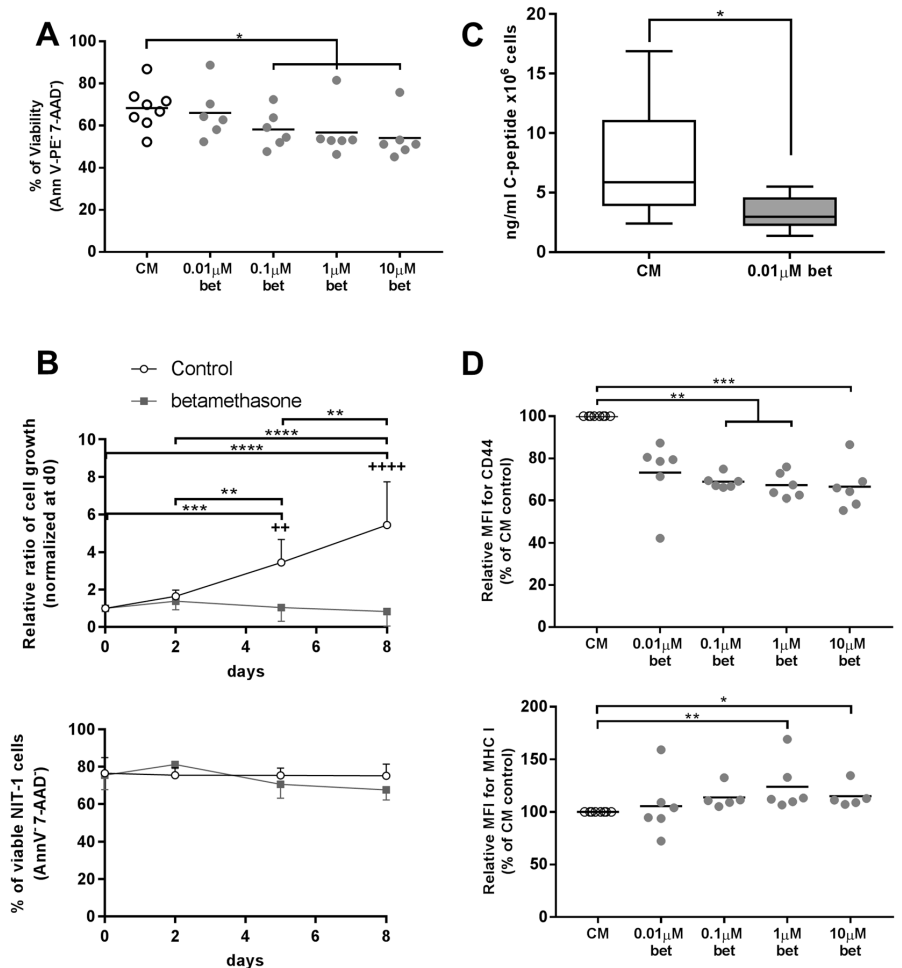
In summary, betamethasone causes transient thymic hypotrophy, changes in the relative frequencies of splenic innate leukocytes and delayed seeding of T and B lymphocytes.

**Betamethasone induces a quiescent state in  $\beta$ -cells.** To determine the effect of betamethasone in the target cells of T1D, a NOD-derived  $\beta$ -cell line, NIT-1, was exposed to increasing concentrations of this drug. After 48 h of culture, a dose-dependent reduction in the viability of NIT-1 was observed (Fig. 6A). To assess the effect of betamethasone on  $\beta$ -cell growth, NIT-1 cells were exposed to 0.1  $\mu$ M betamethasone for 8 days (Fig. 6B, upper panel). NIT-1 cells doubled every 4 days in basal culture conditions but, in contrast, they completely lost their growth potential when exposed to betamethasone (Fig. 6B, upper panel). This effect was not due to a loss of viability (Fig. 6B, lower panel), but rather to cellular quiescence, since the effect was reversible after the removal of betamethasone (data not shown).

**Betamethasone impairs insulin secretion and induces phenotypical changes in  $\beta$ -cells.** Insulin secretion was indirectly determined by measuring C-peptide concentration in culture media. In this sense, metabolic changes were observed in NIT-1 cells after 48 h culture with betamethasone at 0.01  $\mu$ M. This concentration was chosen due to the high preservation of cell viability. Analysis of cell culture supernatants revealed a significant reduction in C-peptide concentration upon betamethasone treatment (Fig. 6C).

Because of their critical role in endogenous antigen presentation and autoimmunity in T1D<sup>16,17</sup>, cell surface expression of CD44 and MHC class I was determined in NIT-1 cells. CD44 expression was reduced when cells were exposed to betamethasone concentrations from 0.1  $\mu$ M (Fig. 6D). In contrast, MHC class I was significantly overexpressed by the effect of betamethasone (1  $\mu$ M) in comparison to control condition. In summary, betamethasone alters NIT-1 cell metabolism and phenotype.

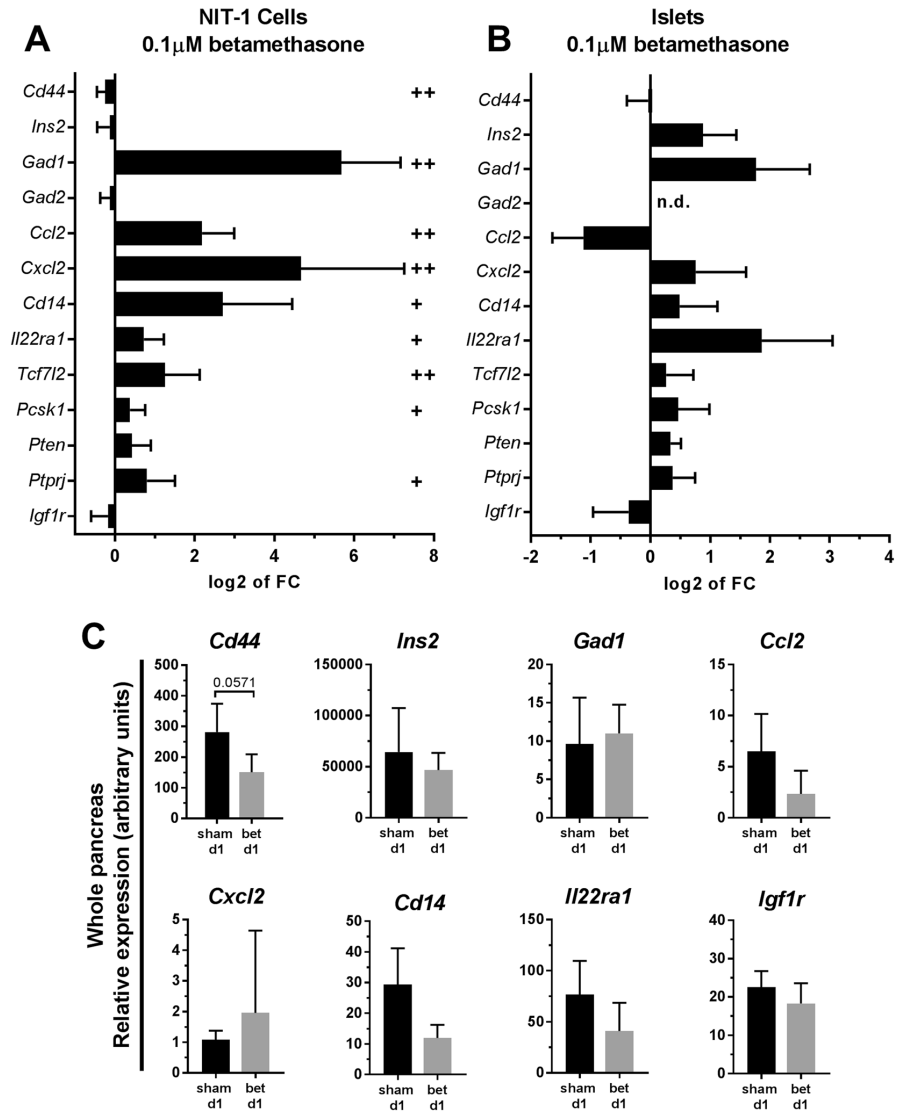
**Betamethasone alters the transcription of genes related to autoimmunity, metabolism and islet mass in T1D target tissue.** To determine putative changes in gene expression induced by betamethasone, 13 genes known to be related to T1D were selected: *Ins2*, *Gad1*, *Gad2* (autoantigens), *Cd44*, *Cd14*, *Ccl2*, *Il22ra1*, *Cxcl2* (related to autoimmunity), and *Tcf7l2*, *Pcsk1*, *Pten*, *Igfr1*, *Ptprj* (related to metabolism and islet cell mass).



**Figure 6.** Betamethasone alters NIT-1 cells proliferation and C-peptide secretion. **(A)** Percentage of viable NIT-1 cells (annexinV PE<sup>-</sup>, 7aad<sup>-</sup>) after 48 h of culture with increasing betamethasone (bet) concentrations [0.01; 0.1; 1 and 10 μM] (grey dots). Basal medium conditions (white circles) were included. Lines show the mean of 6 independent experiments (\* $p \leq 0.05$ , Dunn's test, Kruskal-Wallis). **(B)** Upper panel: relative ratio of NIT-1 cell growth after 8 days of culture with 0.1 μM bet (grey squares) or without bet (white circles). Data presented as mean  $\pm$  s.d. of relative cell number ( $n = 5$  independent experiments), this being relative cell number of each day referred to their respective day 0 cell number (+ $p \leq 0.05$ , +++++ $p < 0.0001$  for betamethasone-control comparison; \* $p \leq 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  for intragroup comparison, Tukey's test, Two-way Anova). Lower panel: percentage of viable NIT-1 cell line (annexinV PE<sup>-</sup>, 7aad<sup>-</sup>) during the 8 days of culture. **(C)** C-peptide concentration in NIT-1 cells' supernatant after 48 h without bet (white box) or with 0.01 μM bet (grey box). Data are represented as ng/ml  $\times 10^6$  cells/ml. Data shown as box and whisker plots (\* $p \leq 0.05$ , Mann-Whitney test). **(D)** Relative median of fluorescence intensity (MFI) of CD44 and MHC class I in NIT-1 cells after 48 h of culture with bet at different concentrations [0.01; 0.1; 1 and 10 μM] (grey symbols) or without bet (white circles). Lines show the mean of  $n = 6$  of relative MFI, this being MFI of each culture condition referred to their respective CM control (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  Dunn's test).

After exposure to betamethasone, a significant upregulation of *Gad1*, *Ccl2*, *Cxcl2*, *Cd14*, *Il22ra1*, *Tcf7l2*, *Pcsk1*, and *Ptprj* and a significant downregulation of *Cd44* were observed in NIT-1 cells (Fig. 7A). No significant changes were found in the expression of *Ins2* and *Gad2*. As expected, a lower concentration of betamethasone (0.01 μM) caused fewer gene expression changes (Suppl. Fig. 7).

Given the differences between NIT-1 insulinoma cell line and islets in composition and function, we determined the effect of betamethasone in isolated islets from NOD mice (Fig. 7B). Betamethasone alters the transcription of the above mentioned genes. A similar gene expression profile was observed in treated islets when



**Figure 7.** Betamethasone exposure alters gene expression in NIT-1 cells, islets of Langerhans and whole pancreas. (A) Relative gene expression of 13 selected genes in NIT-1 cells after betamethasone treatment (0.1  $\mu$ M betamethasone,  $n \geq 8$ ) analysed by qRT-PCR. Gene expression was normalized to *Gapdh*. Bars show the mean  $\pm$  s.d. of the Log<sub>2</sub> of Fold Change (FC) using basal (complete medium-cultured NIT-1) transcription as standard value ( $^+p < 0.05$  and  $^{++}p < 0.01$ , Wilcoxon test). (B) Relative gene expression of 13 selected genes in purified islets of Langerhans from 4 mice after culture with betamethasone (0.1  $\mu$ M betamethasone,  $n = 4$ ) analysed by qRT-PCR. Gene expression was normalized to *Gapdh*. Bars show the mean  $\pm$  s.d. of the Log<sub>2</sub> of FC using basal (complete medium-cultured islets) transcription as standard value (Wilcoxon test); n.d., not detected). (C) Histogram of relative gene expression of 8 selected genes in pancreases from newborn pups prenatally treated with 0.1 mg betamethasone (grey bars) or vehicle control (black bars) ( $n = 4$  pancreases/group) analysed by qRT-PCR. Gene expression was normalized to *Gapdh*. Bars show the mean  $\pm$  s.d. of gene expression (Mann-Whitney test).

compared to NIT-1 cells. Remarkably, 10 out of 13 genes follow the same expression alteration that those observed in NIT-1 cells, and only *Ins2* and *Ccl2* were expressed in the opposite sense. These results, although non significant, show a biological effect of betamethasone in pancreatic islets.

Finally, the expression of eight selected genes after prenatal betamethasone administration was determined in pancreases from NOD pups, 1 day after birth. Figure 7C shows the biological effect, although non significant, of betamethasone in the whole pancreas. According to the effect of betamethasone in the islets, *Cd44*, *Ccl2* and *Igfr1* genes were downregulated and *Gad1* and *Cxcl2* were upregulated. By contrast, the expression of *Ins2*, *Cd14* and *Il22ra1* tended to diminish.

## Discussion

The incidence of T1D is steadily increasing, especially in children<sup>2</sup>. Changes in the environment are likely to contribute, but they are only starting to be identified<sup>18</sup>. A possible explanation is the environment during the perinatal development of the immune system. Prenatal administration of betamethasone is a common treatment used to improve survival of premature newborns. Glucocorticoids, however, are strong immune modulators<sup>19</sup>, but have short- and long-term effects on the immune system. Previous data have demonstrated that prenatal treatment with betamethasone induced changes in murine T cell TCR V $\beta$  repertoire, altering the incidence of autoimmune diseases in the progeny<sup>11</sup>. In the case of T1D, protection from disease was observed in betamethasone-treated NOD offspring. The effect of betamethasone in experimental T1D has been expanded, not only in the immune system but also in the target cells of this disease, the insulin-producing  $\beta$ -cells. In the NOD mouse, betamethasone deteriorated splenocytes' viability and caused a resistance to maturation in DCs, resulting in an inhibition of  $\gamma\delta^+$  T cell proliferation, suggesting a decrease in the immune response. Moreover, prenatal treatment with betamethasone treatment caused thymus and spleen hypotrophy and altered immune cell subsets in newborn NOD mice. Remarkably, betamethasone induced a quiescent state in  $\beta$ -cells, altered insulin secretion and caused phenotypical changes, thus affecting the immunogenicity of T1D target cells.

The thymic hypotrophy observed in newborn treated mice fits well with the *in vitro* toxic effect of betamethasone on thymocytes<sup>20</sup>. A delayed seeding of mature lymphocytes was observed in the spleen, in agreement with reported changes in haematopoiesis induced by glucocorticoid treatment, which favours myeloopoiesis in detriment of lymphopoiesis<sup>13</sup>. Moreover, bone marrow-derived DCs, which are considered crucial antigen presenting cells involved in T1D, were unable to fully mature after *in vitro* betamethasone exposure, independently of the maturation stimuli, thus indicating that the treatment could impair their ability to promote an autoimmune reaction *in vivo*. This is the first demonstration of the effect of betamethasone in DCs in the context of T1D. The beneficial effect of glucocorticoids in autoimmune or autoinflammatory diseases has been previously described. For example, in atopic dermatitis, betamethasone acts on epidermal DCs, and inhibits Th2 response, thus ameliorating this inflammatory disease<sup>21</sup>. Moreover, it is well known that dexamethasone, a drug of the same family, induces a semi-mature phenotype in DCs<sup>22–26</sup>. Furthermore, DCs generated with betamethasone displayed a tolerogenic phenotype, based on the expression of molecules involved in antigen presentation, co-stimulation, and activation, as previously described<sup>27</sup>. These features fit well with the *in vivo* effect of betamethasone and are consistent with a decreased ability to stimulate autologous  $\gamma\delta^+$  T cell proliferation. Also,  $\gamma\delta^+$  T cells have been shown to possess a pathogenic role through IL-17 secretion<sup>28</sup>. The here reported results suggest that maturation-resistant DCs may arrest  $\gamma\delta^+$  T cell proliferation, which is crucial for the development of T1D. By abrogating the cross-talk between these two cell types<sup>29</sup>, T1D incidence can be reduced in NOD mice.

The abovementioned thymic and spleen hypotrophy induced by betamethasone correlates with altered subsets in these lymphoid organs. Alterations in leukocyte types were found after a birth-near injection of betamethasone in NOD pregnant females, consistent with the half-life of the drug. Some of this changes were transient but others were long-lived, as we recently described with long lasting changes in the TCR repertoire<sup>11</sup>. Moreover, normal outcome in thymic development is disrupted by betamethasone treatment<sup>30</sup>, altering DN and DP subsets by enhancing apoptosis of the highly sensitive DP compartment<sup>31</sup> and blocking the cells in the CD8ISP stage thus further reducing the DP cells compartment in the betamethasone-treated offspring<sup>32</sup>, an effect also observed in this study. Interestingly, the detrimental effect of betamethasone in viability is only observed in the CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocyte subset in the thymus and is shown in the periphery, fitting well with the cytotoxic role of this subset in autoimmunity against  $\beta$ -cells. Furthermore, the reduction in the LTIs subset in the spleen of treated mice would impair the establishment of tertiary lymphoid organs<sup>33</sup>, thus, in the pancreas, slowing insulinitis and T1D. Innate immunity was altered by betamethasone, as demonstrated by the drastic increase in peripheral neutrophils, an effect reverted at d4. This effect, due to demargination of the neutrophils, was also reported on premature infants when betamethasone was administered shortly before delivery<sup>34</sup>. Demargination of neutrophils is caused by downregulation of adhesion molecules<sup>35</sup> and changes in the actin matrix of the cell<sup>36</sup>. In summary, prenatal betamethasone effect in developing immune system might be responsible, at least in part, for leukocyte alterations in newborn mice.

The effect of betamethasone on target T1D cells was also evaluated in this study. Several studies suggest that  $\beta$ -cells have an active role in eliciting their own destruction<sup>37,38</sup>. Functional and phenotypical changes in insulin-producing cells are thought to be crucial in the loss of self-tolerance. Although being aware of the differences between primary  $\beta$ -cells and the NOD-derived NIT-1 cell line, it was not technically feasible to obtain islets of Langerhans from newborn pups. The results demonstrated that betamethasone deteriorated NIT-1 cell viability and arrested cell growth, thus preventing the exponential growth phase, as described in other cell lines<sup>39,40</sup>. This effect fits well with the decrease of C-peptide secretion caused by betamethasone, as indirect biomarker of insulin secretion, and with the described effect of synthetic glucocorticoids in islet  $\beta$ -cells, causing a reversible inhibition of insulin secretion<sup>41</sup> but maintaining insulin synthesis. Transcriptomic experiments validate this result. Interestingly, betamethasone-stimulated MHC class I expression –similar to that observed in DC– may amplify endogenous antigen presentation but in combination with the decrease in CD44 expression in  $\beta$ -cells suggest a mechanism of immune evasion. CD44 was selected due to its function in the regulation of cell adhesion and migration, both in insulinitis<sup>16</sup> and in the development of experimental disease<sup>17</sup>. Moreover, anti-CD44 treatment improved insulin production in islet transplantation<sup>42</sup> by reducing graft-infiltrating T cells. Since the expression

of CD44 in  $\beta$ -cells is increased in the pancreases of T1D patients, mainly at T1D onset<sup>43</sup>, thus increasing the susceptibility to autoimmune destruction<sup>44</sup>, the betamethasone-induced downregulation of *Cd44* gene observed in this study may contribute to  $\beta$ -cells protection in the context of autoimmunity.

The phenotypic and functional effects of betamethasone was accompanied by changes in the expression of genes related to autoimmunity, metabolism and islet mass, both in NIT-1 cells and islets such as a downregulation of *Igf1r* and a hyperexpression of *Ptprj*—both genes related to insulin sensing<sup>45</sup>. Moreover, overexpression of the tumour suppressor gene *Pten* explains the inhibition of the *in vitro* cell growth caused by betamethasone<sup>46</sup>. The increased expression of *Cd14* gene, a pattern recognition receptor, suggests a homeostatic mechanism induced by cellular-stress to better regulate insulin secretion<sup>47</sup>. However, no further effect was found in NIT-1 cells due to the absence of LPS, a ligand of the CD14 protein, in the cell culture. Betamethasone may also affect  $\beta$ -cell mass homeostasis by upregulating *Il22ra1* gene, which induces the expression of Regenerating (*Reg*) genes through the effect of IL-22<sup>48</sup>. Again, the absence of the ligand in culture conditions could prevent further expansion.

Betamethasone also altered the expression of *Ccl2* gene in T1D target tissue. This chemokine is involved in the recruitment of monocytes, macrophages, DCs, and activated T-cells, thus leading to islet destruction<sup>49</sup> or tolerance<sup>50</sup>. *Ccl2* gene was downmodulated in betamethasone-treated islets and in the pancreas of prenatally-treated pups, correlating with the reduction of destructive insulinitis. The increased *Ccl2* gene expression observed in NIT-1 cells can be due to its tumoral origin. Another important chemokine in T1D is *Cxcl2*. *Cxcl2* gene was overexpressed by betamethasone in the three different substrates, indicating an increase of neutrophil recruitment to T1D target tissue. Neutrophils have an important role in  $\beta$ -cell destruction when accompanied by T cells in the microenvironment<sup>51</sup>. However, the here reported data suggest that T cell recruitment is halted by *Ccl2* downmodulation. In this scenario, and because apoptotic islet cells removal by neutrophils has anti-inflammatory effects, neutrophils would contribute to reduce inflammation<sup>52</sup>. This alteration fits well with the increased percentages of splenic DCs and neutrophils after betamethasone treatment.

Furthermore, *Gad1* gene—coding for GAD67 autoantigen<sup>53</sup>—was strongly upregulated by betamethasone. It has been reported that glucocorticoids upregulate GAD67<sup>54</sup>. This is the most expressed isoform of GAD. The other isoform, GAD65 is a target autoantigen of very early autoimmune attack in NOD mice<sup>55</sup> that is not affected by betamethasone. The role of GAD67 is less clear but immunization of prediabetic NOD mice with GAD67 prevents the onset of diabetes<sup>56</sup>. The here reported hyperexpression of *Gad1*, together with thymocytic apoptosis, suggests immunomodulatory effects.

It has been previously demonstrated that prenatal administration of betamethasone causes changes in the TCR repertoire influencing the outcome of autoimmunity. The results from this study confirm that other relevant cell types in T1D are affected. Since NOD strain is diabetes-prone, the alteration of the immune system cells disrupts this predisposition. Moreover, the additional effect of betamethasone in reducing  $\beta$ -cell immunogenicity may explain the prevention of the disease by this drug.

Since autoimmune diabetes is different in NOD mice and in humans, it would be interesting to analyse the effects of prenatal administration of betamethasone in children: whether it has the same protective effect or it predisposes to autoimmunity. In this sense, a study performed in a Danish cohort of children studied the effects of the prescription of several corticosteroids to pregnant women<sup>57</sup> according to the route of administration (systemic, inhaled or topical). The results showed a weak increase of the risk of developing T1D in the offspring, but the effects of each corticosteroid was not individually analyzed in this study. We found no specific studies that addressed the effect of the administration prenatal betamethasone in the development of T1D. Further studies should be performed in children prenatally exposed to betamethasone between the week 24 and 34 of pregnancy<sup>58</sup> to determine the prevalence of autoimmune diseases.

Taking into account that the immune system of the newborn is developing<sup>59</sup>, the prenatal immunological remodelling makes the immune system very susceptible to drugs. In fact, it has been reported that prenatal treatment with betamethasone has immunomodulatory effects in newborn infants in terms of acceleration of NK activity, decrease of T cell proliferation, and inappropriate cellular immune responses<sup>60</sup>. These effects last for weeks, and may be harmful for the newborn. Concerns have been raised about the effects of prenatal betamethasone exposure on the developing immune system. In this sense, the amount of betamethasone administered to pregnant women (2 doses of 12 mg) corresponds approximately to 900 nM (for 70 Kg of body weight), and this concentration has no *in vitro* deleterious effect in human leukocyte viability, suggesting that betamethasone is not detrimental for human leukocytes in prenatal treatment.

Given the increase in the incidence of allergies and autoimmune disorders in the last years, elucidating the mechanisms of action of prenatal glucocorticoids will allow the design of prevention strategies. In this sense, the results of this study show that the effect of betamethasone on the developing immune system influences the susceptibility to experimental T1D, by direct effect to immune system cells and to pancreatic  $\beta$ -cells. Understanding the effect of betamethasone in self-tolerance could have potential clinical relevance in T1D.

## Material and Methods

**Mice breeding and treatment.** Wild-type NOD mice, genetically prone to spontaneously develop autoimmune T1D, were obtained from The Jackson Lab (Bar Harbor, ME, USA) and kept under specific pathogen-free conditions. T1D incidence in NOD females was 67%. Mice were mated and the presence of a vaginal plug was considered day 0.5 of pregnancy (E0.5). On day 20 (E20) mice were i.p. injected with 0.1 mg betamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in Phosphate Buffered Saline (PBS, Oxoid Limited, Hampshire, UK) or vehicle control (PBS, Oxoid Limited, plus 10% EtOH, Alcoholes Gual, Pacs del Penedès, Spain). Betamethasone (Sigma-Aldrich) was diluted in ethanol (EtOH, Alcoholes Gual) at 5 mg/mL. For further dilution, PBS (Oxoid Limited) was used.



**Pancreases, islets and cell line.** Newborn pups prenatally treated with betamethasone and controls (4 mice/group) were euthanised at days 1 and 4. Pancreas was removed at day 1 (48 h after betamethasone administration) and snap frozen in an isopentane/cold acetone bath for RNA isolation.

To isolate islets, pancreases from NOD mice were perfused with collagenase (Collagenase P, Roche, Indianapolis, IN) through the common bile duct<sup>61</sup>. Pancreases were removed and incubated at 37 °C for 30 min. After digestion, islets were hand-picked and groups of 10–20 islets were cultured. Culture medium (CM) was RPMI-1640 (Biowest, Nuaille, France) with 10% Foetal Bovine Serum (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 U/mL penicillin (Normon SA, Madrid, Spain), 100 µg/mL streptomycin (Reig Jofre, Sant Joan Despí, Spain), 2 mmol/L glutamine (Sigma-Aldrich), 1 mmol/L sodium pyruvate (Gibco), and 25 µmol/L β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich).

NIT-1 cell line, established from NOD/Lt mice<sup>62</sup>, was chosen because of its similarity to β-cells in terms of autoantigens (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) and cultured in CM. Viability was assessed by staining with annexinV (AnnV) PE (Immunotools, Friesoythe, Germany) and 7-amino-actinomycin D (7aad) labelling (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) and analysed with FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

**Flow cytometry analysis of cells from newborn mice lymphoid organs.** To assess the changes induced by prenatal betamethasone in leukocyte subsets of newborn mice, thymi and spleens of pups euthanised at d1 and d4 were harvested and weighed. Single-cell suspensions were obtained by mechanical disruption. Cells were stained for flow cytometry (FACS Canto II, BD Biosciences) analysis with anti-CD3e eFluor 450 (eBioscience, San Diego, CA, USA), anti-CD4 APC (BD Biosciences), anti-CD4 APC-Cy7 (eBioscience), anti-CD8α PE-Cy7 (eBioscience), anti-CD11b APC (eBioscience), anti-CD11c PE-Cy7 (BD Biosciences), anti-CD19 V450 (BD Biosciences), anti-CD25 PE (BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-CD44 APC (eBioscience), anti-CD45 APC-Cy7 (eBioscience), anti-TCRγδ chain PerCP-Cy5.5 (BioLegend), anti-TCRαβ chain PerCP-Cy5.5 (BioLegend), anti-Ly6g PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences) and Pacific Orange dye (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) for viability. Data were manually analysed using FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). The dimensionality reduction algorithm t-SNE (t-distributed stochastic neighbour embedding) in R, using the CRAN package “Rtsne”, was used for direct comparison of treated and untreated samples.

**In vitro toxicity assay.** To study the effect of betamethasone, spleens from prediabetic NOD mice (8–10 weeks of age) were harvested and single-cell suspensions were obtained by mechanical disruption. After haemolysis, cell number and viability were determined by AnnV PE (Immunotools), 7aad (BD Biosciences) and Perfect Count Microspheres (Cytognos SL, Salamanca, Spain) using flow cytometry (FACS Canto II, BD Biosciences). Splenocytes were cultured at 10<sup>6</sup> cells/mL with 0.1 nM, 1 nM, 2.5 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM or 1000 nM betamethasone or the corresponding controls (PBS). Cell viability was determined as above mentioned at 24 h using flow cytometry. Human PBMCs were obtained from 10 mL blood sample by means of Ficoll Paque (GE Healthcare, Marlborough, MA, USA) density gradient centrifugation. PBMCs were cultered at 10<sup>6</sup> cells/mL with 0.1 nM to 10<sup>6</sup> nM betamethasone. After 48 h, cell viability was determined in PBMCs using flow cytometry as detailed above, and three leukocyte subsets were analyzed using anti-CD3 APC, anti-CD14 APC-Cy7 and anti-CD19 PE (Immunotools).

**Effect of betamethasone on DCs phenotype.** DCs were derived from bone marrow precursors after 7 days of culture with mGM-CSF (Prospecbio, Rehovot, Israel), with or without betamethasone (Sigma-Aldrich) from day 3 until the end of the differentiation protocol. Bone marrow was obtained from femur and tibia bones. After haemolysis, cell number and viability were determined by AnnV PE (Immunotools), 7aad (BD Biosciences) and Perfect Count Microspheres (Cytognos SL) using flow cytometry. Wells were seeded with 10<sup>6</sup> cells/mL in CM with 1000 IU/mL mGM-CSF, and 50% of culture media was replaced on days 3, 5, 7 and 8 with CM supplemented with 10% bovine foetal serum (Gibco), 2 mmol/L glutamine (Sigma-Aldrich), 1 mmol/L sodic pyruvate (Gibco) and 2000 IU/mL mGM-CSF (Prospecbio). Betamethasone was added at increasing concentrations [10 nM, 100 nM and 1000 nM] at days 3–7. On day 8, DCs were cultured with insulin (Sigma-Aldrich) at 20 µg/mL for 2 h and then matured with 100 ng/mL LPS (Sigma-Aldrich) for 24 h or 1 µg/mL CpG (Invivogen, San Diego, CA, USA) for 48 h. Untreated DCs were considered iDCs.

To determine the phenotype, iDCs, mDCs, and MDCs generated with betamethasone at increasing concentrations (10betDCs, 100betDCs, and 1000betDCs) were harvested with accutase (eBioscience), stained with anti-CD11c PE-Cy7 (BD Biosciences), anti-CD25 PE (eBioscience), anti-CD40 APC (BD Biosciences), anti-CD86 PE (eBioscience), anti-Class I MHC eFluor 450 (eBioscience), anti-Class II MHC APC (eBioscience), AnnV PE (Immunotools), and 7aad (BD Biosciences), and analysed by flow cytometry (FACS Canto II, BD Biosciences) using FlowJo software (Tree Star Inc.). Corresponding fluorescence minus one staining was used as control.

**Proliferation assays.** To determine the effect of betamethasone on lymphocyte proliferation, splenocytes from NOD mice were stained with 0.31 µM CFSE (ThermoFisher Scientific) and 2 × 10<sup>5</sup> splenocytes were seeded and cultured with 1 nM, 5 nM, 25 nM betamethasone. To assess the proliferation capacity of splenocytes, 25 ng/mL PMA (Sigma-Aldrich) and 250 ng/mL Ionomycin (IO, Sigma-Aldrich) were added. After 3 days, the cells were harvested and stained with anti-CD3 V450 (BD Bioscience), anti-CD19 PE (BD Bioscience) and 7aad (BD Bioscience) to assess viability and lymphocyte subsets by flow cytometry (LSR Fortessa, BD Biosciences).

To determine the tolerogenic capacities of DCs generated under the effect of betamethasone, CFSE-stained splenocytes were co-cultured with autologous iDCs, mDCs, and with MDCs differentiated in the presence of increasing concentrations of betamethasone at a 10:1 ratio (10<sup>5</sup> splenocytes:10<sup>4</sup> DCs) for 4 days; CM and 25 ng/mL PMA plus 250 ng/mL IO were used as negative and positive controls, respectively. Cells were stained with

anti-CD3 V450 (BD Biosciences), anti-CD4 APC-Cy7 (BD Biosciences), anti-CD8 V500 (BD Biosciences), anti-CD19 PE (BD Biosciences), anti-TCR $\gamma\delta$  PE-Cy7 (BioLegend), and 7aad (BD Biosciences) to assess the viability and the different lymphocyte subsets by flow cytometry (LSR Fortessa, BD Biosciences). Culture supernatant was collected and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. The concentration of IL17A after the co-culture of splenocytes with DCs was assessed using a Ready-Set-Go IL17A ELISA kit (Invitrogen).

**In vitro effect of betamethasone on  $\beta$ -cells.** To further explore betamethasone effect, NIT-1 and isolated islets cells were cultured with CM with or without betamethasone (100 nM, Sigma-Aldrich) for 2–10 days. CM was replaced every 2–3 days.

At least  $5 \times 10^5$  NIT-1 cells were cultured for 2 days with graded concentrations of betamethasone (up to  $10 \mu\text{M}$ ) or CM. Cells were harvested using 0.05% trypsin EDTA (ThermoFisher) and stained for anti-CD44 BV786 (BD Biosciences), anti-Class I MHC eFluor 450 (eBioscience), AnnV PE (ImmunoTools) and 7aad (BD Biosciences). Median Fluorescence Intensity (MFI) and viability were assessed using flow cytometry (LSR Fortessa, BD Biosciences). Corresponding fluorescence minus one staining was used as control. Data were analysed using FlowJo software (Tree Star Inc.). Culture supernatant from NIT-1 cells was frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Insulin secretion was assessed by measuring C-peptide concentration in the supernatant by ELISA (RayBiotech, Norcross, GA, USA).

**Quantitative RT-PCR.** To determine the effects of betamethasone on transcriptome, quantitative RT-PCR was performed. Briefly, RNA was isolated from NIT-1 cells, purified islets and whole pancreases using RNeasy Micro Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), and was reverse-transcribed with a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific). The cDNA synthesis reactions were carried out using random hexamers (0.5 mg/mL, BioTools, Madrid, Spain) and reverse transcriptase Moloney-murine-Leukaemia-virus (200 U/mL, Promega, Madison, WI, USA). For purified islets, targeted cDNA was pre-amplified prior to quantitative real-time PCR with TaqMan PreAmp Master Mix (ThermoFisher Scientific). Quantitative RT-PCR assays were performed by TaqMan universal assay (ThermoFisher Scientific) on a LightCycler<sup>®</sup> 480 (Roche, Mannheim, Germany) using the following TaqMan assays: *Ins2* (Mm00731595\_gH), *Gad1* (Mm04207432\_g1), *Gad2* (Mm00484623\_m1), *Cd44* (Mm01277161\_m1), *Ccl2* (Mm00441242\_m1), *Cxcl2* (Mm00436450\_m1), *Ptprj* (Mm00501277\_m1), *Pten* (Mm00477208\_m1), *Igf1r* (Mm00802831\_m1), *Cd14* (Mm00438094\_g1), *Pcsk1* (Mm00479023\_m1), *Tcf7l2* (Mm00501505\_m1), *Il22ra1* (Mm01192943\_m1). Relative quantification was performed by normalising the expression for each gene to that of the housekeeping gene *GAPDH* (Mm99999915\_g1), as described in the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method<sup>63</sup>. Values from NIT-1 and islets were normalised using their respective CM controls. The genes were selected using a gene–interaction database (Harmonizone)<sup>64</sup> of glucocorticoid receptor, the list of genes differentially expressed in T1D patients<sup>43,65</sup> and other  $\beta$ -cell specific genes<sup>66</sup>.

**Statistical Analysis.** Statistical analysis was performed using Prism 7.0 software (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA). Analysis of variance (Friedman's test) was used for comparisons with several factors using a post-hoc Dunn's test for the comparison between groups. For unpaired data, a non-parametric Mann-Whitney test was used; for paired data, non-parametric Wilcoxon test was used. A sigmoidal non-linear regression was used for IC50 assessment.

**Ethics Statement.** This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Generalitat de Catalunya, Catalan Government. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Germans Trias i Pujol Research Institute (Permit DAAM 8948) and has followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for animal experimental investigation. For human samples, all subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and the study was carried out after the approval and in strict accordance with the guidelines of Germans Trias i Pujol Research Institute and Hospital Ethical Committee.

### Data Availability

The datasets generated and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

### References

- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S. & Michels, A. W. Type 1 diabetes. *Lancet* **383**, 69–82 (2014).
- Tuomilehto, J. The Emerging Global Epidemic of Type 1 Diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **13**, 795–804 (2013).
- Rewers, M. & Ludvigsson, J. Environmental risk factors for type 1 diabetes. *Lancet (London, England)* **387**, 2340–2348 (2016).
- Kumar, D. *et al.* North-American twins with IDDM: Genetic, etiological, and clinical significance of disease concordance according to age, zygosity, and the interval after diagnosis in first twin. *Diabetes* **42**, 1351–1363 (1993).
- Nisticò, L. *et al.* Emerging effects of early environmental factors over genetic background for type 1 diabetes susceptibility: Evidence from a nationwide Italian twin study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, E1483–1491 (2012).
- Harjutsalo, V., Podar, T. & Tuomilehto, J. Cumulative incidence of type 1 diabetes in 10,168 siblings of Finnish young-onset type 1 diabetic patients. *Diabetes* **54**, 563–569 (2005).
- Stene, L. C. & Gale, E. A. M. The prenatal environment and type 1 diabetes. *Diabetologia* **56**, 1888–1897 (2013).
- Leveque, L. & Khosrotehrani, K. Feto-maternal allo-immunity, regulatory T cells and predisposition to auto-immunity. Does it all start in utero? *Chimerism* **5**, 59–62 (2014).
- Ye, J., Vives-Pi, M. & Gillespie, K. M. Maternal Microchimerism: Increased in the Insulin Positive Compartment of Type 1 Diabetes Pancreas but Not in Infiltrating Immune Cells or Replicating Islet Cells. *PLoS One* **9**, e86985 (2014).
- Heninger, A. K. *et al.* A divergent population of autoantigen-responsive CD4+ T cells in infants prior to b cell autoimmunity. *Sci. Transl. Med.* **9**, 1–12 (2017).
- Gieras, A. *et al.* Prenatal administration of betamethasone causes changes in the T cell receptor repertoire influencing development of autoimmunity. *Front. Immunol.* **8** (2017).

12. Liggins, G. C. & Howie, R. N. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* **50**, 515–525 (1972).
13. Solano, M. E., Holmes, M. C., Mittelstadt, P. R., Chapman, K. E. & Tolosa, E. Antenatal endogenous and exogenous glucocorticoids and their impact on immune ontogeny and long-term immunity. *Semin. Immunopathol.* **38**, 739–763 (2016).
14. Diepenbruck, I. *et al.* Effect of prenatal steroid treatment on the developing immune system. *J. Mol. Med.* **91**, 1293–1302 (2013).
15. Driesen, J., Popov, A. & Schultze, J. L. CD25 as an immune regulatory molecule expressed on myeloid dendritic cells. *Immunobiology* **213**, 849–858 (2008).
16. Savinov, A. & Strongin, A. Defining the roles of T cell membrane proteinase and CD44 in type 1 diabetes. *IUBMB Life* **59**, 6–13 (2007).
17. Weiss, L. *et al.* Induction of resistance to diabetes in non-obese diabetic mice by targeting CD44 with a specific monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 285–90 (2000).
18. Knip, M. *et al.* Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes* **54**(Suppl 2), S125–36 (2005).
19. McEvoy, G. *AHFS drug information 2006: Bethesda*. (American society of health-system pharmacists, 2006).
20. Wyllie, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555–556 (1980).
21. Matsui, K., Tamai, S. & Ikeda, R. Betamethasone, but Not Tacrolimus, Suppresses the Development of Th2 Cells Mediated by Langerhans Cell-Like Dendritic Cells. *Biol. Pharm. Bull.* **39**, 1220–1223 (12/20).
22. Qiu, Y. *et al.* Effect of rapamycin and dexamethasone on differentiation and maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* **22**, 582–4 (2006).
23. Naranjo-Gómez, M. *et al.* Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. *J. Transl. Med.* **9**, 89 (2011).
24. Lee, J.-H. *et al.* Tolerogenic dendritic cells are efficiently generated using minocycline and dexamethasone. *Sci. Rep.* **7**, 15087 (2017).
25. Zhao, Y. *et al.* Dexamethasone-induced myeloid-derived suppressor cells prolong allo cardiac graft survival through iNOS- and glucocorticoid receptor-dependent mechanism. *Front. Immunol.* **9** (2018).
26. Luther, C. *et al.* Prednisolone treatment induces tolerogenic dendritic cells and a regulatory milieu in myasthenia gravis patients. *J. Immunol.* **183**, 841–848 (2009).
27. Pujol-Autonell, I. *et al.* Use of Autoantigen-Loaded Phosphatidylserine-Liposomes to Arrest Autoimmunity in Type 1 Diabetes. *PLoS One* **10**, e0127057 (2015).
28. Markle, J. G. M. *et al.* T Cells Are Essential Effectors of Type 1 Diabetes in the Nonobese Diabetic Mouse Model. *J. Immunol.* **190**, 5392–5401 (2013).
29. Casetti, R. & Martino, A. The plasticity of gamma delta T cells: innate immunity, antigen presentation and new immunotherapy. *Cell. Mol. Immunol.* **5**, 161–170 (2008).
30. Zaharie, D., Moleriu, R. D. & Mic, F. A. Modeling the development of the post-natal mouse thymus in the absence of bone marrow progenitors. *Sci. Rep.* **6**, 1–13 (2016).
31. Konkel, J. E., Jin, W., Abbatiello, B., Grainger, J. R. & Chen, W. Thymocyte apoptosis drives the intrathymic generation of regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E465–E473 (2014).
32. Majumdar, S. *et al.* Differential susceptibility and maturation of thymocyte subsets during Salmonella Typhimurium infection: insights on the roles of glucocorticoids and Interferon-gamma. *Sci. Rep.* **7**, 40793 (2017).
33. van de Pavert, S. A. & Mebius, R. E. New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 664–674 (2010).
34. Barak, M., Cohen, A. & Herschkowitz, S. Total leukocyte and neutrophil count changes associated with antenatal betamethasone administration in premature infants. *Acta Paediatr.* **81**, 760–763 (1992).
35. Weber, P. S. D. Mechanisms of glucocorticoid-induced down-regulation of neutrophil L-selectin in cattle: evidence for effects at the gene-expression level and primarily on blood neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 815–827 (2003).
36. Fay, M. E. *et al.* Cellular softening mediates leukocyte demargination and trafficking, thereby increasing clinical blood counts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 1987–1992 (2016).
37. Atkinson, M. A. *et al.* How does type 1 diabetes develop?: the notion of homicide or  $\beta$ -cell suicide revisited. *Diabetes* **60**, 1370–9 (2011).
38. Soleimanpour, S. A. *et al.* The diabetes susceptibility gene Clec16a regulates mitophagy. *Cell* **157**, 1577–90 (2014).
39. Guichard, A. *et al.* Effects of topical corticosteroids on cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis: *In vitro* comparison on HaCaT. *Int. J. Pharm.* **479**, 422–429 (2015).
40. Jin, T. *et al.* Differentiation-inducing effects of betamethasone on human glioma cell line U251. *Genet. Mol. Res.* **14**, 7841–7849 (2015).
41. Lambillotte, C., Gilon, P. & Henquin, J.-C. Direct Glucocorticoid Inhibition of Insulin Secretion An *In Vitro* Study of Dexamethasone Effects in Mouse Islets. *J. Clin. Invest* **99**, 414–423 (1997).
42. Peng, Y. *et al.* Xenoreactive CD4+ memory T cells resist inhibition by anti-CD44 mAb and reject islet grafts via a Th2-dependent pathway. *Xenotransplantation* **18**, 252–261 (2011).
43. Planas, R. *et al.* Gene expression profiles for the human pancreas and purified islets in Type 1 diabetes: New findings at clinical onset and in long-standing diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* **159**, 23–44 (2010).
44. Assayag-Asherie, N. *et al.* Can CD44 Be a Mediator of Cell Destruction? The Challenge of Type 1 Diabetes. *PLoS One* **10**, e0143589 (2015).
45. Krüger, J. *et al.* Enhanced insulin signaling in density-enhanced phosphatase-1 (DEP-1) knockout mice. *Mol. Metab.* **4**, 325–336 (2015).
46. Stiles, B. L. *et al.* Selective Deletion of Pten in Pancreatic Cells Leads to Increased Islet Mass and Resistance to STZ-Induced Diabetes. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2772–2781 (2006).
47. Vives-Pi, M. *et al.* Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. *Clin. Exp. Immunol.* **133**, 208–218 (2003).
48. Hill, T. *et al.* The involvement of interleukin-22 in the expression of pancreatic beta cell regenerative Reg genes. *Cell Regen.* **2** (2013).
49. Martin, A. P. *et al.* Increased expression of CCL2 in insulin-producing cells of transgenic mice promotes mobilization of myeloid cells from the bone marrow, marked insulinitis, and diabetes. *Diabetes* **57**, 3025–3033 (2008).
50. Kriegel, M. A., Rathinam, C. & Flavell, R. A. Pancreatic islet expression of chemokine CCL2 suppresses autoimmune diabetes via tolerogenic CD11c+ CD11b+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 3457–3462 (2012).
51. Diana, J. & Leheun, A. Macrophages and  $\beta$ -cells are responsible for CXCR2-mediated neutrophil infiltration of the pancreas during autoimmune diabetes. *EMBO Mol. Med.* **6**, 1090–104 (2014).
52. Esmann, L. *et al.* Phagocytosis of Apoptotic Cells by Neutrophil Granulocytes: Diminished Proinflammatory Neutrophil Functions in the Presence of Apoptotic Cells. *J. Immunol.* **184**, 391–400 (2010).
53. Choi, S.-E., Noh, H.-L., Kim, H.-M., Yoon, J.-W. & Kang, Y. Streptozotocin Upregulates GAD67 Expression in MIN6N8a Mouse Beta Cells. *J. Autoimmun.* **19**, 1–8 (2002).
54. Kim, K. S. *et al.* Modulation of glucocorticoid-induced GAD expression in pancreatic  $\beta$ -cells by transcriptional activation of the GAD67 promoter and its possible effect on the development of diabetes. *Diabetes* **51**, 2764–2772 (2002).
55. Kash, S. F., Condie, B. G. & Baekkeskov, S. Glutamate decarboxylase and GABA in pancreatic islets: Lessons from knock-out mice. in *Hormone and Metabolic Research* **31**, 340–344 (1999).

56. Elliott, J. F. *et al.* Immunization with the larger isoform of mouse glutamic acid decarboxylase (GAD67) prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* **43**, 1494–1499 (1994).
57. Greene, N. H., Pedersen, L. H., Liu, S. & Olsen, J. Cohort profile: Prenatal prescription corticosteroids and offspring diabetes: A National Cohort Study. *Int. J. Epidemiol.* **42**, 186–193 (2013).
58. Miracle, X. *et al.* Guideline for the use of antenatal corticosteroids for fetal maturation. *J. Perinat. Med.* **36**, 191–196 (2008).
59. Simon, A. K., Hollander, G. A. & McMichael, A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proceedings Biol. Sci.* **282**, 20143085 (2015).
60. Kavelaars, A. *et al.* Altered immune function in human newborns after prenatal administration of betamethasone: Enhanced natural killer cell activity and decreased T cell proliferation in cord blood. *Pediatr. Res.* **45**, 306–312 (1999).
61. Anderson, B., Park, B. J., Verdaguer, J., Amrani, A. & Santamaria, P. Prevalent CD8(+) T cell response against one peptide/MHC complex in autoimmune diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9311–6 (1999).
62. Hamaguchi, K., Gaskins, H. R. & Leiter, E. H. NIT-1, a pancreatic  $\beta$ -cell line established from a transgenic NOD/Lt mouse. *Diabetes* **40**, 842–849 (1991).
63. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
64. Rouillard, A. D. *et al.* The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database* **2016**, baw100 (2016).
65. Pujol-Autonell, I. *et al.* Efferocytosis Promotes Suppressive Effects on Dendritic Cells through Prostaglandin E2 Production in the Context of Autoimmunity. *PLoS One* **8** (2013).
66. Martens, G. A. *et al.* Clusters of Conserved Beta Cell Marker Genes for Assessment of Beta Cell Phenotype. *PLoS One* **6**, e24134 (2011).

## Acknowledgements

We thank Mr. M. Fernandez for technical assistance with flow cytometry. Special thanks to Ms. D. Culler-Young for English grammar assistance. This work has been funded by a grant from the Spanish Government (FIS P115/00198) co-financed with the European Regional Development funds (FEDER), and supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KFO296). CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM) is an initiative from Instituto de Salud Carlos III. SRF is supported by the Agency for Management of University and Research Grants (AGAUR) of the Generalitat de Catalunya.

## Author Contributions

D.P.B., E.T., A.G., I.P.A. and M.V.P. designed the study and interpreted the data; D.P.B., S.R.F. and M.V.P. wrote the manuscript; D.P.B., S.R.F., R.M.A.C. and A.V. performed the experiments; A.G., I.P.A., E.T. and M.V.P. supervised the experiments; and D.P.B., S.R.F., L.G., A.G. and M.V.P. analysed the data. All authors revised the final manuscript and gave final approval of the version to be published.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37878-9>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.





**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019



# 9. Annex

## Annex 1: Consentiment informat i enquesta utilitzada per recollir dades epidemiològiques al Servei de Pediatria de l'HUGTiP.

 <b>Germans Trias i Pujol</b> Hospital	
<b><u>Consentimiento Informado al paciente</u></b>	
<p>En el Hospital Universitario Germans Trias i Pujol (HUGTP) como en muchos otros hospitales la investigación es una parte importante de nuestro trabajo para poder mejorar nuestros servicios médicos.</p> <p>El grupo de Investigación Inmunología de la diabetes en colaboración con los servicios de Pediatría, Endocrinología y Obstetricia lleva a cabo un estudio sobre la influencia de los fármacos administrados en ocasiones al final del embarazo sobre el sistema inmune del niño.</p> <p>El objetivo de este estudio es determinar si los glucocorticoides influyen en el riesgo de desarrollar diabetes tipo 1. El glucocorticoide llamado betametasona se administra directamente a la madre si hay riesgo de parto prematuro para acelerar el desarrollo de los pulmones en el feto, reduciendo drásticamente la mortalidad de los bebés prematuros.</p> <p>Para colaborar, tan solo se le solicitará la autorización de la cesión de datos clínicos utilizando una encuesta corta, que será correspondientemente anonimizada después de su obtención y sólo se utilizarán para la realización del estudio de forma gratuita y sin ánimo lucrativo. Los resultados obtenidos del estudio, cuando sean divulgados, no incluirán en ningún caso información personal del paciente. Personal sanitario, debidamente cualificado, podrá revisar sus datos y su historia clínica para comprobar que el estudio se está llevando correctamente y que usted ha dado su consentimiento informado.</p> <p>Su participación en el estudio es completamente voluntaria, pudiendo rechazar su participación sin tener que dar por ello ninguna explicación. En este caso nunca se verá afectado el tratamiento que usted está recibiendo para su enfermedad ni existirá merma alguna en la calidad de la asistencia por parte de su médico</p> <p>Otros detalles o dudas sobre el estudio que usted quiera conocer le serán explicados por quien le entregue esta documentación.</p> <p>Por favor firme el consentimiento si está de acuerdo en participar en el estudio. Tras firmar el documento recibirá una copia del mismo.</p>	
DNI paciente	Firma del paciente
Nombre doctor	Firma del doctor
<small>Carretera de Can Ruti, Camí de les Escoles s/n 08916 Badalona, Barcelona, Spain Tel: (+34) 934 978 655 Fax: (+34) 934 978 654 <a href="http://www.germantrias.org">http://www.germantrias.org</a> Inscrita amb el número 909 en el Registre de Fundacions Privades de la Generalitat de Catalunya VAT code/CIF G-60805462</small>	



Germans Trias i Pujol  
Hospital



Encuesta:

1. ¿Cuántos hijos/as tiene?

Número =

2. ¿Alguno de sus hijos/as tiene Diabetes tipo 1? ¿Qué edad tenía en el diagnóstico? Responda para cada hijo/a.

	Si	No	Edad debut
1º Hijo/a			
2º Hijo/a			
3º Hijo/a			
4º Hijo/a			
5º Hijo/a			

3. ¿Alguno de sus hijo/as nació de forma prematura? Responda para cada hijo/a. Si lo recuerda, especifique las semanas de embarazo y el peso para cada hijo/a.

	Prematuro	A termino	Semanas	Peso
1º Hijo/a				
2º Hijo/a				
3º Hijo/a				
4º Hijo/a				
5º Hijo/a				

4. ¿Recibió usted al final del embarazo un tratamiento (dos inyecciones) para la maduración del feto (betametasona\*)? Responda para cada hijo/a.

	Si	No
1º Hijo/a		
2º Hijo/a		
3º Hijo/a		
4º Hijo/a		
5º Hijo/a		

\*Nombre comercial: Celestone Cronodose™ tratamiento de dos o cuatro dosis intramusculares entre las 24 i 34,6 semanas

Carretera de Can Ruti, Camí de les Escoles s/n  
08916 Badalona, Barcelona, Spain

Tel: (+34) 934 978 655 Fax: (+34) 934 978 654 <http://www.germanstrias.org>

Inscrita amb el número 909 en el Registre de Fundacions Privades de la Generalitat de Catalunya VAT code/CIF G-60805462

## 10. Bibliografia

Abeler-Dörner, L., Swamy, M., Williams, G., Hayday, A.C., and Bas, A. (2012). Butyrophilins: an emerging family of immune regulators. *Trends Immunol.* 33, 34–41.

Adkins, B., Leclerc, C., and Marshall-Clarke, S. (2004). Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 553–564.

Akashi, M., Nagafuchi, S., Anzai, K., Kondo, S., Kitamura, D., Wakana, S., Ono, J., Kikuchi, M., Niho, Y., and Watanabe, T. (1997). Direct evidence for the contribution of B cells to the progression of insulinitis and the development of diabetes in non-obese diabetic mice. *Int. Immunol.* 9, 1159–1164.

Alam, C., Bittoun, E., Bhagwat, D., Valkonen, S., Saari, A., Jaakkola, U., Eerola, E., Huovinen, P., and Hänninen, A. (2011). Effects of a germ-free environment on gut immune regulation and diabetes progression in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetologia* 54, 1398–1406.

Alba, A., Puertas, M.C., Carrillo, J., Planas, R., Ampudia, R., Pastor, X., Bosch, F., Pujol-borrell, R., Verdaguer, J., and Vives-pi, M. (2004). IFN-beta Accelerates Autoimmune Type 1 Diabetes in Nonobese Diabetic Mice and Breaks the Tolerance to beta-Cells in Nondiabetes-Prone Mice. *J. Immunol.* 173, 6667–6675.

Alhadj Ali, M., Thrower, S.L., Hanna, S.J., Coulman, S.A., Birchall, J.C., Wong, F.S., Dayan, C.M., and Tatovic, D. (2015). Topical steroid therapy induces pro-tolerogenic changes in Langerhans cells in human skin. *Immunology* 146, 411–422.

Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M., and Betz, A.G. (2004). Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.* 5, 266–271.

Anderson, B., Park, B.J., Verdaguer, J., Amrani, A., and Santamaria, P. (1999). Prevalent CD8(+) T cell response against one peptide/MHC complex in autoimmune diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9311–9316.

Andrade, S.E., Gurwitz, J.H., Davis, R.L., Chan, K.A., Finkelstein, J.A., Fortman, K., McPhillips, H., Raebel, M.A., Roblin, D., Smith, D.H., et al. (2004). Prescription drug use in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 191, 398–407.

Arif, S., Moore, F., Marks, K., Bouckenooghe, T., Dayan, C.M., Planas, R., Vives-Pi, M., Powrie, J., Tree, T., Marchetti, P., et al. (2011). Peripheral and islet interleukin-17 pathway activation characterizes human autoimmune diabetes and promotes cytokine-mediated  $\beta$ -cell death. *Diabetes* 60, 2112–2119.



Ashkar, A., and Rosenthal, K. (2002). Toll-like Receptor 9, CpG DNA and Innate Immunity. *Curr. Mol. Med.* 2, 545–556.

Assayag-Asherie, N., Sever, D., Bogdani, M., Johnson, P., Weiss, T., Ginzberg, A., Perles, S., Weiss, L., Sebban, L.E., Turley, E.A., et al. (2015). Can CD44 Be a Mediator of Cell Destruction? The Challenge of Type 1 Diabetes. *PLoS One* 10, e0143589.

Atkinson, M.A., Bluestone, J.A., Eisenbarth, G.S., Hebrok, M., Herold, K.C., Accili, D., Pietropaolo, M., Arvan, P.R., Von Herrath, M., Markel, D.S., et al. (2011). How does type 1 diabetes develop?: the notion of homicide or  $\beta$ -cell suicide revisited. *Diabetes* 60, 1370–1379.

Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S., and Michels, A.W. (2014). Type 1 diabetes. *Lancet* 383, 69–82.

Barak, M., Cohen, A., and Herschkowitz, S. (1992). Total leukocyte and neutrophil count changes associated with antenatal betamethasone administration in premature infants. *Acta Paediatr.* 81, 760–763.

Baroutis, G., Mousiolis, A., Mesogitis, S., Costalos, C., and Antsaklis, A. (2013). Preterm birth trends in Greece, 1980-2008: A rising concern. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 92, 575–582.

Beck, S., Wojdyla, D., Say, L., Betran, A.P., Merialdi, M., Requejo, J.H., Rubens, C., Menon, R., and Van Look, P.F.A. (2010). The worldwide incidence of preterm birth: A systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull. World Health Organ.* 88, 31–38.

Behboudi, S., Chao, D., Klenerman, P., and Austyn, J. (2000). The effects of DNA containing CpG motif on dendritic cells. *Immunology* 99, 361–366.

Berkovich, R. (2016). Treatment of Acute Relapses in Multiple Sclerosis. In *Translational Neuroimmunology in Multiple Sclerosis: From Disease Mechanisms to Clinical Applications*. Book Chapter, pp. 307–326.

Bertrand, J.Y. (2006). Fetal spleen stroma drives macrophage commitment. *Development* 133, 3619–3628.

Beura, L.K., Hamilton, S.E., Bi, K., Schenkel, J.M., Odumade, O.A., Casey, K.A., Thompson, E.A., Fraser, K.A., Rosato, P.C., Filali-Mouhim, A., et al. (2016). Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature* 532, 512–516.

Beyerlein, A., Chmiel, R., Hummel, S., Winkler, C., Bonifacio, E., and Ziegler, A.G. (2014). Timing of gluten introduction and islet autoimmunity in young children: Updated results from the Babydiet study. *Diabetes Care* 37, e194–e195.

Bhenke, M., and Smith, V.C. (2013). Prenatal Substance Abuse: Short-and Long-term Effects on the Exposed Fetus. *Pediatrics* 131, e1009–e1024.

- Biola, A., Andréau, K., David, M., Sturm, M., Haake, M., Bertoglio, J., and Pallardy, M. (2000). The glucocorticoid receptor and STAT6 physically and functionally interact in T-lymphocytes. *FEBS Lett.* *487*, 229–233.
- Blanco, P., Palucka, A.K., Pascual, V., and Banchereau, J. (2008). Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* *19*, 41–52.
- Blencowe, H., Cousens, S., Oestergaard, M.Z., Chou, D., Moller, A.-B., Narwal, R., Adler, A., Vera Garcia, C., Rohde, S., Say, L., et al. (2012). National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet (London, England)* *379*, 2162–2172.
- Blumenfeld, O., Dichtiar, R., Shohat, T., Bistrizter, Z., Rahmeal, M., Klar, A., Vardi, P., Koren, I., German, A., Majdub, H., et al. (2014). Trends in the incidence of type 1 diabetes among Jews and Arabs in Israel. *Pediatr. Diabetes* *15*, 422–427.
- Bofill, M., Janossy, G., Janossa, M., Burford, G.D., Seymour, G.J., Wernet, P., and Kelemen, E. (1985). Human B cell development. II. Subpopulations in the human fetus. *J. Immunol.* *134*, 1531–1538.
- Bouwens, L., and Rooman, I. (2005). Regulation of Pancreatic Beta-Cell Mass. *Physiol. Rev.* *85*, 1255–1270.
- Bradfield, J.P., Qu, H.Q., Wang, K., Zhang, H., Sleiman, P.M., Kim, C.E., Mentch, F.D., Qiu, H., Glessner, J.T., Thomas, K.A., et al. (2011). A genome-wide meta-analysis of six type 1 diabetes cohorts identifies multiple associated loci. *PLoS Genet.* *7*.
- Brodie, G.M., Wallberg, M., Santamaria, P., Wong, F.S., and Green, E.A. (2008). B-cells promote intra-islet CD8+ cytotoxic T-cell survival to enhance type 1 diabetes. *Diabetes* *57*, 909–917.
- Bruno, G., Maule, M., Biggeri, A., Ledda, A., Mannu, C., Merletti, F., and Songini, M. (2013). More than 20 years of registration of type 1 diabetes in sardinian children: Temporal variations of incidence with age, period of diagnosis, and year of birth. *Diabetes* *62*, 3542–3546.
- Bulek, A.M., Cole, D.K., Skowera, A., Dolton, G., Gras, S., Madura, F., Fuller, A., Miles, J.J., Gostick, E., Price, D.A., et al. (2012). Structural basis for the killing of human beta cells by CD8+ T cells in type 1 diabetes. *Nat. Immunol.* *13*, 283–289.
- Buttgereit, F., Szechinski, J., Doring, G., Witte, S., Knauer, C., Grahn, A., and Saag, K.G. (2010). Safety of a novel modified-release (MR) prednisone formulation: Results of the circadian administration of prednisone in rheumatoid arthritis (CAPRA) studies. *Arthritis Rheum.* *62*, 1123.
- Cain, D.W., and Cidlowski, J.A. (2017). Immune regulation by glucocorticoids. *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 233–247.

Cardozo, A.K., Ortis, F., Storling, J., Feng, Y.H., Rasschaert, J., Tonnesen, M., Van Eylen, F., Mandrup-Poulsen, T., Herchuelz, A., and Eisirik, D.L. (2005). Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca<sup>2+</sup> ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>, leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* 54, 452–461.

Cardwell, C.R., Carson, D.J., and Patterson, C.C. (2008). No association between routinely recorded infections in early life and subsequent risk of childhood-onset Type 1 diabetes: A matched case-control study using the UK General Practice Research Database. *Diabet. Med.* 25, 261–267.

Carrascal, J., Carrillo, J., Arpa, B., Egia-Mendikute, L., Rosell-Mases, E., Pujol-Autonell, I., Planas, R., Mora, C., Mauricio, D., Ampudia, R.M., et al. (2016). B-cell anergy induces a Th17 shift in a novel B lymphocyte transgenic NOD mouse model, the 116C-NOD mouse. *Eur. J. Immunol.* 46, 593–608.

Carrero, J.A., McCarthy, D.P., Ferris, S.T., Wan, X., Hu, H., Zinselmeyer, B.H., Vomund, A.N., and Unanue, E.R. (2017). Resident macrophages of pancreatic islets have a seminal role in the initiation of autoimmune diabetes of NOD mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E10418–E10427.

Casetti, R., and Martino, A. (2008). The plasticity of gamma delta T cells: innate immunity, antigen presentation and new immunotherapy. *Cell. Mol. Immunol.* 5, 161–170.

Castaing, M., Péault, B., Basmaciogullari, A., Casal, I., Czernichow, P., and Scharfmann, R. (2001). Blood glucose normalization upon transplantation of human embryonic pancreas into beta-cell-deficient SCID mice. *Diabetologia* 44, 2066–2076.

Castaing, M., Duvillié, B., Quemeneur, E., Basmaciogullari, A., and Scharfmann, R. (2005). Ex vivo analysis of acinar and endocrine cell development in the human embryonic pancreas. *Dev. Dyn.* 234, 339–345.

Chan, J.S., Cowie, R.L., Lazarenka, G.C., Little, C., Scott, S., and Ford, G.T. (2001). Comparison of intramuscular betamethasone and oral prednisone in the prevention of relapse of acute asthma. *Can. Respir. J.* 8, 147–152.

Chang, C. (2014). Unmet needs in the treatment of autoimmunity: From aspirin to stem cells. *Autoimmun. Rev.* 13, 331–346.

Chang, T.J., Scher, B.M., Waxman, S., and Scher, W. (1993). Inhibition of mouse gata-1 function by the glucocorticoid receptor: Possible mechanism of steroid inhibition of erythroleukemia cell differentiation. *Mol. Endocrinol.* 7, 528–542.

Chappert, P., and Schwartz, R.H. (2010). Induction of T cell anergy: integration of environmental cues and infectious tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 552–559.

Chmelova, H., Cohrs, C.M., Chouinard, J.A., Petzold, C., Kuhn, M., Chen, C., Roeder, I., Kretschmer, K., and Speier, S. (2015). Distinct roles of  $\beta$ -Cell mass and function

during type 1 diabetes onset and remission. *Diabetes* 64, 2148–2160.

Choi, S.-E., Noh, H.-L., Kim, H.-M., Yoon, J.-W., and Kang, Y. (2002). Streptozotocin Upregulates GAD67 Expression in MIN6N8a Mouse Beta Cells. *J. Autoimmun.* 19, 1–8.

Colli, M.L., Hill, J.L.E., Marroquí, L., Chaffey, J., Dos Santos, R.S., Leete, P., Coomans de Brachène, A., Paula, F.M.M., Op de Beeck, A., Castela, A., et al. (2018). PDL1 is expressed in the islets of people with type 1 diabetes and is up-regulated by interferons- $\alpha$  and- $\gamma$  via IRF1 induction. *EBioMedicine* 36, 367–375.

Cooper, J.D., Smyth, D.J., Smiles, A.M., Plagnol, V., Walker, N.M., Allen, J.E., Downes, K., Barrett, J.C., Healy, B.C., Mychaleckyj, J.C., et al. (2008). Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nat. Genet.* 40, 1399–1401.

Coppieters, K.T., Dotta, F., Amirian, N., Campbell, P.D., Kay, T.W.H., Atkinson, M.A., Roep, B.O., and Herrath, M.G. von (2012). Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. *J. Exp. Med.* 209, 51–60.

Corinti, S., Albanesi, C., la Sala, A., Pastore, S., and Girolomoni, G. (2001). Regulatory Activity of Autocrine IL-10 on Dendritic Cell Functions. *J. Immunol.* 166, 4312–4318.

Craig, M.E., Kim, K.W., Isaacs, S.R., Penno, M.A., Hamilton-Williams, E.E., Couper, J.J., and Rawlinson, W.D. (2019). Early-life factors contributing to type 1 diabetes. *Diabetologia* 62, 1823–1834.

Creusot, R.J., Postigo-Fernandez, J., and Teteloshvili, N. (2018). Altered Function of Antigen-Presenting Cells in Type 1 Diabetes: A Challenge for Antigen-Specific Immunotherapy? *Diabetes* 67, 1481–1494.

Crowther, C.A., McKinlay, C.J., Middleton, P., and Harding, J.E. (2011). Repeat doses of prenatal corticosteroids for women at risk of preterm birth for improving neonatal health outcomes. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003935.

Czock, D., Keller, F., Rasche, F.M., and Häussler, U. (2005). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin. Pharmacokinet.* 44, 61–98.

Dahlquist, G.G., Blom, L.G., Persson, L.A., Sandström, A.I., and Wall, S.G. (1990). Dietary factors and the risk of developing insulin dependent diabetes in childhood. *BMJ* 300, 1302–1306.

Dahlquist, G.G., Pundziūtė-Lyckå, A., Nyström, L., and Groups, S.C.D.S. and the D.I.S. in S. (DISS) (2005). Birthweight and risk of type 1 diabetes in children and young adults: a population-based register study. *Diabetologia* 48, 1114–1117.

Daley-Yates, P.T. (2015). Inhaled corticosteroids: Potency, dose equivalence and

therapeutic index. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *80*, 372–380.

Davies, N.P., Buggins, A.G.S., Snijders, R.J.M., Jenkins, E., Layton, D.M., and Nicolaidis, K.H. (1992). Blood leucocyte count in the human fetus. *Arch. Dis. Child.* *67*, 399–403.

DeLong, T., Wiles, T.A., Baker, R.L., Bradley, B., Barbour, G., Reisdorph, R., Armstrong, M., Powell, R.L., Reisdorph, N., Kumar, N., et al. (2016). Pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes recognize epitopes formed by peptide fusion. *Science* (80-.). *351*, 711–714.

Delvecchio, M., Mozzillo, E., Salzano, G., Iafusco, D., Frontino, G., Patera, P.I., Rabbone, I., Cherubini, V., Grasso, V., Tinto, N., et al. (2017). Monogenic Diabetes Accounts for 6.3% of Cases Referred to 15 Italian Pediatric Diabetes Centers During 2007 to 2012. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *102*, 1826–1834.

Diana, J., and Lehuen, A. (2014). Macrophages and  $\beta$ -cells are responsible for CXCR2-mediated neutrophil infiltration of the pancreas during autoimmune diabetes. *EMBO Mol. Med.* *6*, 1090–1104.

Diana, J., Simoni, Y., Furio, L., Beaudoin, L., Agerberth, B., Barrat, F., and Lehuen, A. (2013). Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nat. Med.* *19*, 65–73.

Diepenbruck, I., Much, C.C., Krumbholz, A., Kolster, M., Thieme, R., Thieme, D., Diepenbruck, S., Solano, M.E., Arck, P.C., and Tolosa, E. (2013). Effect of prenatal steroid treatment on the developing immune system. *J. Mol. Med.* *91*, 1293–1302.

DiMeglio, L.A., Evans-Molina, C., and Oram, R.A. (2018). Type 1 diabetes. *Lancet* *391*, 2449–2462.

Diz, R., Garland, A., Vincent, B.G., Johnson, M.C., Spidale, N., Wang, B., and Tisch, R. (2012). Autoreactive Effector/Memory CD4+ and CD8+ T Cells Infiltrating Grafted and Endogenous Islets in Diabetic NOD Mice Exhibit Similar T Cell Receptor Usage. *PLoS One* *7*, e52054.

Dooley, J., Tian, L., Schonefeldt, S., Delghingaro-Augusto, V., Garcia-Perez, J.E., Pasciuto, E., Di Marino, D., Carr, E.J., Oskolkov, N., Lyssenko, V., et al. (2016). Genetic predisposition for beta cell fragility underlies type 1 and type 2 diabetes. *Nat. Genet.* *48*, 519–527.

Dor, F.J.M.F., Ramirez, M.L., Parmar, K., Altman, E.L., Huang, C.A., Down, J.D., and Cooper, D.K.C. (2006). Primitive hematopoietic cell populations reside in the spleen: Studies in the pig, baboon, and human. *Exp. Hematol.* *34*, 1573–1582.

Draper, N., and Stewart, P.M. (2005).  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *J. Endocrinol.* *186*, 251–271.

- Driesen, J., Popov, A., and Schultze, J.L. (2008). CD25 as an immune regulatory molecule expressed on myeloid dendritic cells. *Immunobiology* 213, 849–858.
- Dudek, N.L., and Purcell, A.W. (2014). The Beta Cell Immunoepitome. In *Vitamins and Hormones*, pp. 115–144.
- Elfving, M., Svensson, J., Oikarinen, S., Jonsson, B., Olofsson, P., Sundkvist, G., Lindberg, B., Lernmark, Å., Hyöty, H., and Ivarsson, S.-A. (2008). Maternal Enterovirus Infection during Pregnancy as a Risk Factor in Offspring Diagnosed with Type 1 Diabetes between 15 and 30 Years of Age. *Exp. Diabetes Res.* 2008, 1–6.
- Elliott, J.F., Qin, H.Y., Bhatti, S., Smith, D.K., Singh, R.K., Dillon, T., Lauzon, J., and Singh, B. (1994). Immunization with the larger isoform of mouse glutamic acid decarboxylase (GAD67) prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 43, 1494–1499.
- Elovaara, I., Lällä, M., Spare, E., Lehtimäki, T., and Dastidar, P. (1998). Methylprednisolone reduces adhesion molecules in blood and cerebrospinal fluid in patients with MS. *Neurology* 51, 1703–1708.
- Esebanmen, G.E., and Langridge, W.H.R. (2017). The role of TGF-beta signaling in dendritic cell tolerance. *Immunol. Res.* 65, 987–994.
- Esmann, L., Idel, C., Sarkar, A., Hellberg, L., Behnen, M., Möller, S., van Zandbergen, G., Klinger, M., Köhl, J., Bussmeyer, U., et al. (2010). Phagocytosis of Apoptotic Cells by Neutrophil Granulocytes: Diminished Proinflammatory Neutrophil Functions in the Presence of Apoptotic Cells. *J. Immunol.* 184, 391–400.
- Fay, M.E., Myers, D.R., Kumar, A., Turbyfield, C.T., Byler, R., Crawford, K., Mannino, R.G., Laohapant, A., Tyburski, E.A., Sakurai, Y., et al. (2016). Cellular softening mediates leukocyte demargination and trafficking, thereby increasing clinical blood counts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 1987–1992.
- Federman, D.G., Froelich, C.W., and Kirsner, R.S. (1999). Topical psoriasis therapy. *Am. Fam. Physician* 59, 957–962.
- Feng, N., Vegh, P., Rothenberg, E. V., and Yui, M.A. (2011). Lineage Divergence at the First TCR-Dependent Checkpoint: Preferential  $\gamma\delta$  and Impaired  $\alpha\beta$  T Cell Development in Nonobese Diabetic Mice. *J. Immunol.* 186, 826–837.
- Feyaerts, D., Benner, M., van Cranenbroek, B., van der Heijden, O.W.H., Joosten, I., and van der Molen, R.G. (2017). Human uterine lymphocytes acquire a more experienced and tolerogenic phenotype during pregnancy. *Sci. Rep.* 7, 2884.
- Fireman, P. (2003). Understanding asthma pathophysiology. In *Allergy and Asthma Proceedings*, pp. 79–83.
- Forga, L., Tamayo, I., Chueca, M., Ibáñez, B., Sainz de los Terreros, A., Goñi, M.J.,

and en representación del Grupo de Estudio de Diabetes tipo 1 de Navarra (2018). La incidencia de diabetes tipo 1, en Navarra, se ha estabilizado en los últimos 8 años. *Endocrinol. Diabetes Y Nutr.* 65, 274–279.

Fowden, A.L., and Forhead, A.J. (2015). Glucocorticoids as regulatory signals during intrauterine development. *Exp. Physiol.* 100, 1477–1487.

Frederiksen, B., Kroehl, M., Lamb, M.M., Seifert, J., Barriga, K., Eisenbarth, G.S., Rewers, M., and Norris, J.M. (2013). Infant exposures and development of type 1 diabetes mellitus: The Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *JAMA Pediatr.* 167, 808–815.

Frohman, E.M., Shah, A., Eggenberger, E., Metz, L., Zivadinov, R., and Stüve, O. (2007). Corticosteroids for Multiple Sclerosis: I. Application for Treating Exacerbations. *Neurotherapeutics* 4, 618–626.

Fujita, S., Seino, K., Sato, K., Sato, Y., Eizumi, K., Yamashita, N., Taniguchi, M., and Sato, K. (2006). Regulatory dendritic cells act as regulators of acute lethal systemic inflammatory response. *107*, 3656–3664.

Funda, D., Stenvang, J.P., and Buschard, K. (1995). Age-related changes in T gamma delta cells of NOD mice. *Immunol. Lett.* 45, 179–17984.

Gale, E.A.M., and Gillespie, K.M. (2001). Diabetes and gender. *Diabetologia* 44, 3–15.

García-Arévalo, M., Alonso-Magdalena, P., Servitja, J.-M., Boronat-Belda, T., Merino, B., Villar-Pazos, S., Medina-Gómez, G., Novials, A., Quesada, I., and Nadal, A. (2016). Maternal Exposure to Bisphenol-A During Pregnancy Increases Pancreatic  $\beta$ -Cell Growth During Early Life in Male Mice Offspring. *Endocrinology* 157, 4158–4171.

García-González, P., Morales, R., Hoyos, L., Maggi, J., Campos, J., Pesce, B., Gárate, D., Larrondo, M., González, R., Soto, L., et al. (2013). A short protocol using dexamethasone and monophosphoryl lipid A generates tolerogenic dendritic cells that display a potent migratory capacity to lymphoid chemokines. *J. Transl. Med.* 11, 128.

Van Gassen, N., Staels, W., Van Overmeire, E., De Groef, S., Sojoodi, M., Heremans, Y., Leuckx, G., Van de Castele, M., Van Ginderachter, J.A., Heimberg, H., et al. (2015). Concise Review: Macrophages: Versatile Gatekeepers During Pancreatic  $\beta$ -Cell Development, Injury, and Regeneration. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 555–563.

Gieras, A., Gehbauer, C., Perna-Barrull, D., Engler, J.B., Diepenbruck, I., Glau, L., Joesse, S.A., Kersten, N., Klinge, S., Mittrücker, H.-W., et al. (2017). Prenatal Administration of Betamethasone Causes Changes in the T Cell Receptor Repertoire Influencing Development of Autoimmunity. *Front. Immunol.* 8, 1505.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F.,

Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* (80-. ). 330, 841–845.

Godin, I., Garcia-Porrero, J.A., Dieterlen-Lièvre, F., and Cumano, A. (2002). Stem Cell Emergence and Hemopoietic Activity Are Incompatible in Mouse Intraembryonic Sites. *J. Exp. Med.* 190, 43–52.

Goldacre, R.R. (2018). Associations between birthweight, gestational age at birth and subsequent type 1 diabetes in children under 12: a retrospective cohort study in England, 1998–2012. *Diabetologia* 61, 616–625.

Golub, R., and Cumano, A. (2013). Embryonic hematopoiesis. *Blood Cells, Mol. Dis.* 51, 226–231.

Gomez-Diaz, R.A., Perez-Perez, G., Hernandez-Cuesta, I.T., Rodriguez-Garcia, J. d. C., Guerrero-Lopez, R., Aguilar-Salinas, C.A., and Wachter, N.H. (2012). Incidence of Type 1 Diabetes in Mexico: Data From an Institutional Register 2000-2010. *Diabetes Care* 35, e77–e77.

Grad, I., and Picard, D. (2007). The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol. Cell. Endocrinol.* 275, 2–12.

Graham, J., Hagopian, W.A., Kockum, I., Li, L.S., Sanjeevi, C.B., Lowe, R.M., Schaefer, J.B., Zarghami, M., Day, H.L., Landin-Olsson, M., et al. (2002). Genetic effects on age-dependent onset and islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes. *Diabetes* 51, 1346–1355.

Greene, N.H., Pedersen, L.H., Liu, S., and Olsen, J. (2013). Cohort profile: Prenatal prescription corticosteroids and offspring diabetes: A National Cohort Study. *Int. J. Epidemiol.* 42, 186–193.

Guichard, A., Humbert, P., Tissot, M., Muret, P., Courderot-Masuyer, C., and Viennet, C. (2015). Effects of topical corticosteroids on cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis: In vitro comparison on HaCaT. *Int. J. Pharm.* 479, 422–429.

Habib, G.S. (2009). Systemic effects of intra-articular corticosteroids. *Clin. Rheumatol.* 28, 749–756.

Hamaguchi, K., Gaskins, H.R., and Leiter, E.H. (1991). NIT-1, a pancreatic  $\beta$ -cell line established from a transgenic NOD/Lt mouse. *Diabetes* 40, 842–849.

Han, G., Wang, R., Chen, G., Wang, J., Xu, R., Wang, L., Feng, J., Li, X., Guo, R., Fu, L., et al. (2010). Interleukin-17-producing gammadelta+ T cells protect NOD mice from type 1 diabetes through a mechanism involving transforming growth factor-beta. *Immunology* 129, 197–206.

Haque, M., Sandhu, P., Ravi, S., Kurapati, S., and Song, J. (2017). Immunotherapy in Autoimmune Diabetes. In *Immunopathogenesis and Immune-Based Therapy*



for Selected Autoimmune Disorders, (InTech), p. Available from: <https://www.intechopen.com/books/i>.

Hattori, M., Buse, J., Jackson, R., Glimcher, L., Dorf, M., Minami, M., Makino, S., Moriwaki, K., Kuzuya, H., Imura, H., et al. (1986). The NOD mouse: recessive diabetogenic gene in the major histocompatibility complex. *Science* (80- ). *231*, 733–735.

Hegde, V.L., Singh, N.P., Nagarkatti, P.S., and Nagarkatti, M. (2008). CD44 mobilization in allogeneic dendritic cell-T cell immunological synapse plays a key role in T cell activation. *J. Leukoc. Biol.* *84*, 134–142.

Hench, P.S., and Kendall, E.C. (1949). The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* *24*, 181–197.

Hetland, M.L., Østergaard, M., Ejbjerg, B., Jacobsen, S., Stengaard-Pedersen, K., Junker, P., Lottenburger, T., Hansen, I., Andersen, L.S., Tarp, U., et al. (2012). Short- and long-term efficacy of intra-articular injections with betamethasone as part of a treat-to-target strategy in early rheumatoid arthritis: Impact of joint area, repeated injections, MRI findings, anti-CCP, IgM-RF and CRP. *Ann. Rheum. Dis.* *71*, 851–856.

Hibbard, J.U., Wilkins, I., Sun, L., Gregory, K., Haberman, S., Hoffman, M., Kominiarek, M.A., Reddy, U., Bailit, J., Branch, D.W., et al. (2010). Respiratory morbidity in late preterm births. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* *304*, 419–425.

Hill, T., Krougly, O., Nikoopour, E., Bellemore, S., Lee-Chan, E., Fouser, L.A., Hill, D.J., and Singh, B. (2013). The involvement of interleukin-22 in the expression of pancreatic beta cell regenerative Reg genes. *Cell Regen.* *2*, 2:2.

Hinman, R.M., and Cambier, J.C. (2014). Role of B Lymphocytes in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. *Curr. Diab. Rep.* *14*, 1–7.

Hirano, T., Homma, M., Oka, K., Tsushima, H., Niitsuma, T., and Hayashi, T. (1998). Individual variations in lymphocyte-responses to glucocorticoids in patients with bronchial asthma: comparison of potencies for five glucocorticoids. *Immunopharmacology* *40*, 57–66.

Holgate, S.T., and Polosa, R. (2006). The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. *Lancet* *368*, 780–793.

Holladay, S.D., and Smialowicz, R.J. (2000). Development of the murine and human immune system: Differential effects of immunotoxicants depend on time of exposure. *Environ. Health Perspect.* *108*, 463–473.

Homo-Delarche, F. (2001). Is pancreas development abnormal in the non-obese diabetic mouse, a spontaneous model of type I diabetes? *Brazilian J. Med. Biol. Res.* *34*, 437–447.

- Hussen, H.I., Persson, M., and Moradi, T. (2013). The trends and the risk of type 1 diabetes over the past 40 years: an analysis by birth cohorts and by parental migration background in Sweden. *BMJ Open* 3, e003418.
- Hyttinen, V., Kaprio, J., Kinnunen, L., Koskenvuo, M., and Tuomilehto, J. (2003). Genetic Liability of Type 1 Diabetes and the Onset Age Among 22,650 Young Finnish Twin Pairs. *Diabetes* 52, 1052–1055.
- Ilonen, J., Hammais, A., Laine, A.P., Lempainen, J., Vaarala, O., Veijola, R., Simell, O., and Knip, M. (2013). Patterns of  $\beta$ -cell autoantibody appearance and genetic associations during the first years of life. *Diabetes* 62, 3636–3640.
- Imkampe, A.K., and Gulliford, M.C. (2011). Trends in Type1 diabetes incidence in the UK in 0- to 14-year-olds and in 15- to 34-year-olds, 1991-2008. *Diabet. Med.* 28, 811–814.
- Infante, M., Ricordi, C., Sanchez, J., Clare-Salzler, M.J., Padilla, N., Fuenmayor, V., Chavez, C., Alvarez, A., Baidal, D., Alejandro, R., et al. (2019). Influence of Vitamin D on Islet Autoimmunity and Beta-Cell Function in Type 1 Diabetes. *Nutrients* 11, 2185.
- Ito, M., Nakashima, A., Hidaka, T., Okabe, M., Bac, N.D., Ina, S., Yoneda, S., Shiozaki, A., Sumi, S., Tsuneyama, K., et al. (2010). A role for IL-17 in induction of an inflammation at the fetomaternal interface in preterm labour. *J. Reprod. Immunol.* 84, 75–85.
- Janossy, G., Bofill, M., Poulter, L.W., Rawlings, E., Burford, G.D., Navarrete, C., Ziegler, A., and Kelemen, E. (1986). Separate ontogeny of two macrophage-like accessory cell populations in the human fetus. *J. Immunol.* 136, 4354–4361.
- Jansen, A., Homo-Delarche, F., Hooijkaas, H., Leenen, P.J., Dardenne, M., and Drexhage, H.A. (1994). Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes* 43, 667–675.
- Jayasimhan, A., Mansour, K.P., and Slattery, R.M. (2013). Advances in our understanding of the pathophysiology of Type 1 diabetes: lessons from the NOD mouse. *Clin. Sci.* 126, 1–18.
- Jennings, R.E., Berry, A.A., Kirkwood-Wilson, R., Roberts, N.A., Hearn, T., Salisbury, R.J., Blaylock, J., Hanley, K.P., and Hanley, N.A. (2013). Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment. *Diabetes* 62, 3514–3522.
- Jennings, R.E., Berry, A.A., Strutt, J.P., Gerrard, D.T., and Hanley, N.A. (2015). Human pancreas development. *Development* 142, 3126–3137.
- Jensen, J.M., Pfeiffer, S., Witt, M., Bräutigam, M., Neumann, C., Weichenthal, M., Schwarz, T., Fölster-Holst, R., and Proksch, E. (2009). Different effects of pimecrolimus and betamethasone on the skin barrier in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 1124–1133.

Jiang, Z., and Liu, F. (2019). Butyrophilin-Like 9 (BTNL9) Suppresses Invasion and Correlates with Favorable Prognosis of Uveal Melanoma. *Med. Sci. Monit.* 25, 3190–3198.

Jin, N., Wang, Y., Crawford, F., White, J., Marrack, P., Dai, S., and Kappler, J.W. (2015a). N-terminal additions to the WE14 peptide of chromogranin A create strong autoantigen agonists in type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 13318–13323.

Jin, T., Wang, Y.X., Fan, K., Tao, D.B., Dong, X., and Shen, J.S. (2015b). Differentiation-inducing effects of betamethasone on human glioma cell line U251. *Genet. Mol. Res.* 14, 7841–7849.

Jonat, C., Rahmsdorf, H.J., Park, K.-K., Cato, A.C.B., Gebel, S., Ponta, H., and Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: Down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62, 1189–1204.

Jones, A.C., Miles, E.A., Warner, J.O., Colwell, B.M., Bryant, T.N., and Warner, J.A. (1996). Fetal peripheral blood mononuclear cell proliferative responses to mitogenic and allergenic stimuli during gestation. *Pediatr. Allergy Immunol.* 7, 109–116.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Steinbrink, K., and Enk, A.H. (2001). Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol.* 22, 394–400.

Karvonen, M. (2006). Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet. Med.* 23, 857–866.

Kash, S.F., Condie, B.G., and Baekkeskov, S. (1999). Glutamate decarboxylase and GABA in pancreatic islets: Lessons from knock-out mice. In *Hormone and Metabolic Research*, pp. 340–344.

Kay, T.W.H., Campbell, I.L., Oxbrow, L., and Harrison, L.C. (1991). Overexpression of class I major histocompatibility complex accompanies insulinitis in the non-obese diabetic mouse and is prevented by anti-interferon- $\gamma$  antibody. *Diabetologia* 34, 779–785.

Kendall, P.L., Yu, G., Woodward, E.J., and Thomas, J.W. (2007). Tertiary Lymphoid Structures in the Pancreas Promote Selection of B Lymphocytes in Autoimmune Diabetes. *J. Immunol.* 178, 5643–5651.

Khandelwal, M., Chang, E., Hansen, C., Hunter, K., and Milcarek, B. (2012). Betamethasone dosing interval: 12 or 24 hours apart? A randomized, noninferiority open trial. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 206, 201.e1-201.e11.

Kiel, M.J., Yilmaz, Ö.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121, 1109–1121.

- Kim, K.S., Kang, Y., Choi, S.E., Kim, J.H., Kim, H.M., Sun, B., Jun, H.S., and Yoon, J.W. (2002). Modulation of glucocorticoid-induced GAD expression in pancreatic  $\beta$ -cells by transcriptional activation of the GAD67 promoter and its possible effect on the development of diabetes. *Diabetes* 51, 2764–2772.
- Kimani, S.G., Geng, K., Kasikara, C., Kumar, S., Sriram, G., Wu, Y., and Birge, R.B. (2014). Contribution of Defective PS Recognition and Efferocytosis to Chronic Inflammation and Autoimmunity. *Front. Immunol.* 5, 566.
- Kimura, A., and Kishimoto, T. (2010). IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol.* 40, 1830–1835.
- King, J.P., Gazmararian, J.A., and Shapiro-Mendoza, C.K. (2014). Disparities in mortality rates among US infants born late preterm or early term, 2003-2005. *Matern. Child Health J.* 18, 233–241.
- Kirwan, J., and Power, L. (2007). Glucocorticoids: Action and new therapeutic insights in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 19, 233–237.
- Knight, R.R., Kronenberg, D., Zhao, M., Huang, G.C., Eichmann, M., Bulek, A., Wooldridge, L., Cole, D.K., Sewell, A.K., Peakman, M., et al. (2013). Human  $\beta$ -cell killing by autoreactive preproinsulin-specific CD8 T cells is predominantly granule-mediated with the potency dependent upon T-cell receptor avidity. *Diabetes* 62, 205–213.
- Köck, K., Köck, F., Klein, K., Bancher-Todesca, D., and Helmer, H. (2010). Diabetes mellitus and the risk of preterm birth with regard to the risk of spontaneous preterm birth. *J. Matern. Neonatal Med.* 23, 1004–1008.
- Koide, Y., Kaidoh, T., Nakamura, M., and Yoshida, T.O. (1994). Molecular Analysis of the Pathogenesis of Autoimmune Insulinitis in NOD Mice. *Tohoku J. Exp. Med.* 1, 157–170.
- Kollmann, T.R., Crabtree, J., Rein-Weston, A., Blimkie, D., Thommai, F., Wang, X.Y., Lavoie, P.M., Furlong, J., Fortuno, E.S., Hajjar, A.M., et al. (2009). Neonatal Innate TLR-Mediated Responses Are Distinct from Those of Adults. *J. Immunol.* 183, 7150–7160.
- Kondrashova, A., Seiskari, T., Ilonen, J., Knip, M., and Hyöty, H. (2013). The “Hygiene hypothesis” and the sharp gradient in the incidence of autoimmune and allergic diseases between Russian Karelia and Finland. *APMIS* 121, 478–493.
- Konkel, J.E., Jin, W., Abbatiello, B., Grainger, J.R., and Chen, W. (2014). Thymocyte apoptosis drives the intrathymic generation of regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E465–E473.
- Kostic, A.D., Gevers, D., Siljander, H., Vatanen, T., Hyötyläinen, T., Hämäläinen, A.-M., Peet, A., Tillmann, V., Pöhö, P., Mattila, I., et al. (2015). The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe* 17, 260–273.

Kriegel, M.A., Rathinam, C., and Flavell, R.A. (2012). Pancreatic islet expression of chemokine CCL2 suppresses autoimmune diabetes via tolerogenic CD11c+ CD11b+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 3457–3462.

Krischer, J.P., Lynch, K.F., Schatz, D.A., Ilonen, J., Lernmark, Å., Hagopian, W.A., Rewers, M.J., She, J.X., Simell, O.G., Toppari, J., et al. (2015). The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study. *Diabetologia* *58*, 980–987.

Krogvold, L., Edwin, B., Buanes, T., Frisk, G., Skog, O., Anagandula, M., Korsgren, O., Undlien, D., Eike, M.C., Richardson, S.J., et al. (2015). Detection of a Low-Grade Enteroviral Infection in the Islets of Langerhans of Living Patients Newly Diagnosed With Type 1 Diabetes. *Diabetes* *64*, 1682–1687.

Krüger, J., Brachs, S., Trappiel, M., Kintscher, U., Meyborg, H., Wellenhofer, E., Thöne-Reineke, C., Stawowy, P., Östman, A., Birkenfeld, A.L., et al. (2015). Enhanced insulin signaling in density-enhanced phosphatase-1 (DEP-1) knockout mice. *Mol. Metab.* *4*, 325–336.

Krysko, D. V., D’Herde, K., and Vandenabeele, P. (2006). Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis* *11*, 1709–1726.

Kumar, P., and Subramaniam, G. (2015). Molecular underpinnings of Th17 immune-regulation and their implications in autoimmune diabetes. *Cytokine* *71*, 366–376.

Kumar, D., Gemayel, N.S., Deapen, D., Kapadia, D., Yamashita, P.H., Lee, M., Dwyer, J.H., Roy-burman, P., Bray, G.A., and Mack, T.M. (1993). North-American twins with IDDM: Genetic, etiological, and clinical significance of disease concordance according to age, zygosity, and the interval after diagnosis in first twin. *Diabetes* *42*, 1351–1363.

Kupka, M.S., D’Hooghe, T., Ferraretti, A.P., De Mouzon, J., Erb, K., Castilla, J.A., Calhaz-Jorge, C., De Geyter, C., and Goossens, V. (2016). Assisted reproductive technology in Europe, 2011: Results generated from European registers by ESHRE. *Hum. Reprod.* *31*, 233–248.

Kyvik, K.O., Green, A., and Beck-Nielsen, H. (1995). Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins. *BMJ* *311*, 913–917.

Lamb, M., Miller, M., Seifert, J.A., Frederiksen, B., Kroehl, M., Rewers, M., and Norris, J.M. (2015). The effect of childhood cow’s milk intake and HLA-DR genotype on risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes: The Diabetes Autoimmunity Study in the Young. *Pediatr. Diabetes* *16*, 31–38.

Lamb, M.M., Yin, X., Barriga, K., Hoffman, M.R., Barón, A.E., Eisenbarth, G.S., Rewers, M., and Norris, J.M. (2008). Dietary glycemic index, development of islet autoimmunity, and subsequent progression to type 1 diabetes in young children.

- J. Clin. Endocrinol. Metab. 93, 3936–3942.
- Lambillotte, C., Gilon, P., and Henquin, J.-C. (1997). Direct Glucocorticoid Inhibition of Insulin Secretion An In Vitro Study of Dexamethasone Effects in Mouse Islets. *J. Clin. Invest* 99, 414–423.
- Laopaiboon, M., Lumbiganon, P., Intarut, N., Mori, R., Ganchimeg, T., Vogel, J.P., Souza, J.P., Gülmezoglu, A.M., and WHO Multicountry Survey on Maternal Newborn Health Research Network (2014). Advanced maternal age and pregnancy outcomes: a multicountry assessment. *BJOG* 121 *Suppl*, 49–56.
- Lawrence, J.M., Imperatore, G., Dabelea, D., Mayer-Davis, E.J., Linder, B., Saydah, S., Klingensmith, G.J., Dolan, L., Standiford, D.A., Pihoker, C., et al. (2014). Trends in incidence of type 1 diabetes among non-hispanic white youth in the U.S., 2002-2009. *Diabetes* 63, 3938–3945.
- Lee, J.-H., Park, C.-S., Jang, S., Kim, J.-W., Kim, S.-H., Song, S., Kim, K., and Lee, C.-K. (2017). Tolerogenic dendritic cells are efficiently generated using minocycline and dexamethasone. *Sci. Rep.* 7, 15087.
- Lee, Y.J., Wang, H., Starrett, G.J., Phuong, V., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2015). Tissue-Specific Distribution of iNKT Cells Impacts Their Cytokine Response. *Immunity* 43, 566–578.
- Leete, P., Willcox, A., Krogvold, L., Dahl-Jørgensen, K., Foulis, A.K., Richardson, S.J., and Morgan, N.G. (2016). Differential insulinitic profiles determine the extent of  $\beta$ -cell destruction and the age at onset of type 1 diabetes. *Diabetes* 65, 1362–1369.
- Li, S., Zhang, M., Tian, H., Liu, Z., Yin, X., and Xi, B. (2014). Preterm birth and risk of type 1 and type 2 diabetes: Systematic review and meta-analysis. *Obes. Rev.* 15, 804–811.
- Lieberman, A.C., Refojo, D., Druker, J., Toscano, M., Rein, T., Holsboer, F., and Arzt, E. (2007). The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction. *FASEB J.* 21, 1177–1188.
- Liggins, G.C., and Howie, R.N. (1972). A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 50, 515–525.
- Lim, H.K., and O’Neill, H.C. (2019). Identification of Stromal Cells in Spleen Which Support Myelopoiesis. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 1.
- Lindahl, M., Danilova, T., Palm, E., Lindholm, P., Vöikar, V., Hakonen, E., Ustinov, J., Andressoo, J.-O., Harvey, B.K., Otonkoski, T., et al. (2014). MANF Is Indispensable for the Proliferation and Survival of Pancreatic  $\beta$  Cells. *Cell Rep.* 7, 366–375.
- Liu, J.-P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1)

and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 59–72.

Liu, X., Turban, S., Carter, R.N., Ahmad, S., Ramage, L., Webster, S.P., Walker, B.R., Seckl, J.R., and Morton, N.M. (2014).  $\beta$ -Cell-Specific Glucocorticoid Reactivation Attenuates Inflammatory  $\beta$ -Cell Destruction. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 5, 165.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods* 25, 402–408.

Longui, C.A., Santos, M.C., Formiga, C.B., Oliveira, D.V.A., Rocha, M.N., Faria, C.D.C., Kochi, C., and Monte, O. (2005). Antiproliferative and apoptotic potencies of glucocorticoids: nonconcordance with their antiinflammatory and immunosuppressive properties. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 49, 378–383.

Ludvigsson, J.F., Neovius, M., Söderling, J., Gudbjörnsdóttir, S., Svensson, A.-M., Franzén, S., Stephansson, O., and Pasternak, B. (2019). Maternal Glycemic Control in Type 1 Diabetes and the Risk for Preterm Birth. *Ann. Intern. Med.* 170, 691.

Luther, C., Adamopoulou, E., Stoeckle, C., Brucklacher-Waldert, V., Rosenkranz, D., Stoltze, L., Lauer, S., Poeschel, S., Melms, A., and Tolosa, E. (2009). Prednisolone treatment induces tolerogenic dendritic cells and a regulatory milieu in myasthenia gravis patients. *J. Immunol.* 183, 841–848.

Majumdar, S., Deobagkar-Lele, M., Adiga, V., Raghavan, A., Wadhwa, N., Ahmed, S.M., Rananaware, S.R., Chakraborty, S., Joy, O., and Nandi, D. (2017). Differential susceptibility and maturation of thymocyte subsets during *Salmonella Typhimurium* infection: insights on the roles of glucocorticoids and Interferon-gamma. *Sci. Rep.* 7, 40793.

Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K., and Tochino, Y. (1980). Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu.* 29, 1–13.

Mannering, S.I., Morris, J.S., Stone, N.L., Jensen, K.P., Endert, P.M., and Harrison, L.C. (2004). CD4 + T Cell Proliferation in Response to GAD and Proinsulin in Healthy, Pre-diabetic, and Diabetic Donors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1037, 16–21.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686.

Manuwald, U., Heinke, P., Salzsieder, E., Hegewald, J., Schoffer, O., Kugler, J., Kapellen, T.M., Kiess, W., and Rothe, U. (2017). Incidence trends of type 1 diabetes before and after the reunification in children up to 14 years of age in Saxony, Eastern Germany. *PLoS One* 12, e0183665.

Marin-Gallen, S., Clemente-Casares, X., Planas, R., Pujol-Autonell, I., Carrascal, J., Carrillo, J., Ampudia, R., Verdaguier, J., Pujol-Borrell, R., Borràs, F.E., et al. (2010). Dendritic cells pulsed with antigen-specific apoptotic bodies prevent

experimental type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* *160*, 207–214.

Mariño, E., Richards, J.L., McLeod, K.H., Stanley, D., Yap, Y.A., Knight, J., McKenzie, C., Kranich, J., Oliveira, A.C., Rossello, F.J., et al. (2017). Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes. *Nat. Immunol.* *18*, 552–562.

Markle, J.G.M., Mortin-Toth, S., Wong, A.S.L., Geng, L., Hayday, A., and Danska, J.S. (2013).  $\gamma\delta$  T Cells Are Essential Effectors of Type 1 Diabetes in the Nonobese Diabetic Mouse Model. *J. Immunol.* *190*, 5392–5401.

Marrero, I., Hamm, D.E., and Davies, J.D. (2013). High-Throughput Sequencing of Islet-Infiltrating Memory CD4<sup>+</sup> T Cells Reveals a Similar Pattern of TCR V $\beta$  Usage in Prediabetic and Diabetic NOD Mice. *PLoS One* *8*, 1–16.

Marrero, I., Aguilera, C., Hamm, D.E., Quinn, A., and Kumar, V. (2016). High-throughput sequencing reveals restricted TCR V $\beta$  usage and public TCR $\beta$  clonotypes among pancreatic lymph node memory CD4<sup>+</sup>T cells and their involvement in autoimmune diabetes. *Mol. Immunol.* *74*, 82–95.

Martin, A.P., Rankin, S., Pitchford, S., Charo, I.F., Furtado, G.C., and Lira, S.A. (2008). Increased expression of CCL2 in insulin-producing cells of transgenic mice promotes mobilization of myeloid cells from the bone marrow, marked insulinitis, and diabetes. *Diabetes* *57*, 3025–3033.

Matsudaa, A., and Kuzuya, T. (1994). Diabetic twins in Japan. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *24*, S63–S67.

Mayer-Davis, E.J., Lawrence, J.M., Dabelea, D., Divers, J., Isom, S., Dolan, L., Imperatore, G., Linder, B., Marcovina, S., Pettitt, D.J., et al. (2017). Incidence Trends of Type 1 and Type 2 Diabetes among Youths, 2002–2012. *N. Engl. J. Med.* *376*, 1419–1429.

McCarthy, M.K., and Weinberg, J.B. (2015). The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation. *Front. Microbiol.* *6*, 21.

McCombe, P.A., Nickson, I., Tabi, Z., and Pender, M.P. (1996). Corticosteroid treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat results in loss of V $\beta$ 8.2<sup>+</sup> and myelin basic protein-reactive cells from the spinal cord, with increased total T-cell apoptosis but reduced apoptosis of V $\beta$ 8.2<sup>+</sup> cells. *J. Neuroimmunol.* *70*, 93–101.

McGrath, P.S., Watson, C.L., Ingram, C., Helmrath, M.A., and Wells, J.M. (2015). The basic helix-loop-helix transcription factor neurog3 is required for development of the human endocrine pancreas. *Diabetes* *64*, 2497–2505.

Meadow, W.L., Bell, A., and Sunstein, C.R. (2003). Statistics, not memories: What was the standard of care for administering antenatal steroids to women in preterm labor between 1985 and 2000? *Obstet. Gynecol.* *102*, 356–362.



Meier, J.J., Bhushan, A., Butler, A.E., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2005). Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? *Diabetologia* 48, 2221–2228.

Melandri, D., Zlatareva, I., Chaleil, R.A.G., Dart, R.J., Chancellor, A., Nussbaumer, O., Polyakova, O., Roberts, N.A., Wesch, D., Kabelitz, D., et al. (2018). The  $\gamma\delta$ TCR combines innate immunity with adaptive immunity by utilizing spatially distinct regions for agonist selection and antigen responsiveness. *Nat. Immunol.* 19, 1352–1365.

Menges, M., Rößner, S., Voigtländer, C., Schindler, H., Kukutsch, N.A., Bogdan, C., Erb, K., Schuler, G., and Lutz, M.B. (2002). Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor  $\alpha$  induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J. Exp. Med.* 195, 15–21.

Merritt, T.A., Goldstein, M., Philips, R., Peverini, R., Iwakoshi, J., Rodriguez, A., and Oshiro, B. (2014). Impact of ART on pregnancies in California: An analysis of maternity outcomes and insights into the added burden of neonatal intensive care. *J. Perinatol.* 34, 345–350.

Mestas, J., and Hughes, C.C.W. (2004). Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J. Immunol.* 172, 2731–2738.

Migliaccio, G., Migliaccio, A.R., Petti, S., Mavilio, F., Russo, G., Lazzaro, D., Testa, U., Marinucci, M., and Peschle, C. (1986). Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac-liver transition. *J. Clin. Invest.* 78, 51–60.

Miller, W.L. (2008). Steroidogenic Enzymes. In *Disorders of the Human Adrenal Cortex*, (Basel: KARGER), pp. 1–18.

Miracle, X., Di Renzo, G.C., Stark, A., Fanaroff, A., Carbonell-Estrany, X., and Saling, E. (2008). Guideline for the use of antenatal corticosteroids for fetal maturation. *J. Perinat. Med.* 36, 191–196.

Morelli, A.E., Zahorchak, A.F., Larregina, A.T., Colvin, B.L., Logar, A.J., Takayama, T., Faló, L.D., and Thomson, A.W. (2001). Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. *Blood* 98, 1512–1523.

Naranjo-Gómez, M., Raich-Regué, D., Oñate, C., Grau-López, L., Ramo-Tello, C., Pujol-Borrell, R., Martínez-Cáceres, E., and Borràs, F.E. (2011). Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. *J. Transl. Med.* 9, 89.

Navarro-Barriuso, J., Mansilla, M.J., Naranjo-Gómez, M., Sánchez-Pla, A., Quirant-Sánchez, B., Teniente-Serra, A., Ramo-Tello, C., and Martínez-Cáceres, E.M. (2018). Comparative transcriptomic profile of tolerogenic dendritic cells differentiated with vitamin D3, dexamethasone and rapamycin. *Sci. Rep.* 8, 14985.

Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Denis, M., and Gustafsson, J.A. (1990). The

transformed glucocorticoid receptor has a lower steroid-binding affinity than the nontransformed receptor. *Biochemistry* 29, 1880–1886.

Nguyen, T., Liu, X.K., Zhang, Y., and Dong, C. (2006). BTNL2, a butyrophilin-like molecule that functions to inhibit T cell activation. *J. Immunol.* 176, 7354–7360.

Nicolaides, N.C., Charmandari, E., Kino, T., and Chrousos, G.P. (2017). Stress-Related and Circadian Secretion and Target Tissue Actions of Glucocorticoids: Impact on Health. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 8, 70.

Nisticò, L., Iafusco, D., Galderisi, A., Fagnani, C., Cotichini, R., Toccaceli, V., Stazi, M.A., Cherubini, V., Iannilli, A., Paparusso, A.M., et al. (2012). Emerging effects of early environmental factors over genetic background for type 1 diabetes susceptibility: Evidence from a nationwide Italian twin study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E1483-1491.

Nogueira, T.C., Paula, F.M., Villate, O., Colli, M.L., Moura, R.F., Cunha, D.A., Marselli, L., Marchetti, P., Cnop, M., Julier, C., et al. (2013). GLIS3, a Susceptibility Gene for Type 1 and Type 2 Diabetes, Modulates Pancreatic Beta Cell Apoptosis via Regulation of a Splice Variant of the BH3-Only Protein Bim. *PLoS Genet.* 9, e1003532.

Norris, J.M., Barriga, K., Klingensmith, G., Hoffman, M., Eisenbarth, G.S., Erlich, H.A., and Rewers, M. (2003). Timing of Initial Cereal Exposure in Infancy and Risk of Islet Autoimmunity. *J. Am. Med. Assoc.* 290, 1713–1720.

Nyirenda, M.J., and Seckl, J.R. (1998). Intrauterine events and the programming of adulthood disease: the role of fetal glucocorticoid exposure (Review). *Int. J. Mol. Med.* 2, 607–614.

O'Brien, B.A., Geng, X., Orteu, C.H., Huang, Y., Ghoreishi, M., Zhang, Y.Q., Bush, J.A., Li, G., Finegood, D.T., and Dutz, J.P. (2006). A deficiency in the in vivo clearance of apoptotic cells is a feature of the NOD mouse. *J. Autoimmun.* 26, 104–115.

Oakley, R.H., and Cidlowski, J.A. (2011a). Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: New mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 286, 3177–3184.

Oakley, R.H., and Cidlowski, J.A. (2011b). Cellular Processing of the Glucocorticoid Receptor Gene and Protein: New Mechanisms for Generating Tissue-specific Actions of Glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 286, 3177–3184.

Oei, J.L. (2018). Adult consequences of prenatal drug exposure. *Intern. Med. J.* 48, 25–31.

Otonkoski, T., Andersson, S., Knip, M., and Simell, O. (1988). Maturation of insulin response to glucose during human fetal and neonatal development. Studies with perfusion of pancreatic isletlike cell clusters. *Diabetes* 37, 286–291.

Ozbakir, B., Crielaard, B.J., Metselaar, J.M., Storm, G., and Lammers, T. (2014). Liposomal corticosteroids for the treatment of inflammatory disorders and cancer. *J. Control. Release* *190*, 624–636.

Pan, F.C., and Wright, C. (2011). Pancreas organogenesis: From bud to plexus to gland. *Dev. Dyn.* *240*, 530–565.

Parsa, R., Andresen, P., Gillett, A., Mia, S., Zhang, X.-M., Mayans, S., Holmberg, D., and Harris, R.A. (2012). Adoptive Transfer of Immunomodulatory M2 Macrophages Prevents Type 1 Diabetes in NOD Mice. *Diabetes* *61*, 2881–2892.

van de Pavert, S.A., and Mebius, R.E. (2010). New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 664–674.

Peng, Y., Laouar, Y., Li, M.O., Green, E.A., and Flavell, R.A. (2004). TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4572–4577.

Peng, Y., Chen, J., Shao, W., Wang, F., Dai, H., Cheng, P., Xia, J., Wang, F., Huang, R., Zhu, Q., et al. (2011). Xenoreactive CD4+ memory T cells resist inhibition by anti-CD44 mAb and reject islet grafts via a Th2-dependent pathway. *Xenotransplantation* *18*, 252–261.

Perrett, K.P., Jachno, K., Nolan, T.M., and Harrison, L.C. (2019). Association of Rotavirus Vaccination With the Incidence of Type 1 Diabetes in Children. *JAMA Pediatr.* *173*, 280.

Petrou, S. (2019). Health economic aspects of late preterm and early term birth. *Semin. Fetal Neonatal Med.* *24*, 18–26.

Phillips, J.H. (1992). Ontogeny of human natural killer (NK) cells: fetal NK cells mediate cytolytic function and express cytoplasmic CD3 epsilon,delta proteins. *J. Exp. Med.* *175*, 1055–1066.

Piper, K., Brickwood, S., Turnpenny, L.W., Cameron, I.T., Ball, S.G., Wilson, D.I., and Hanley, N.A. (2004). Beta cell differentiation during early human pancreas development. *J. Endocrinol.* *181*, 11–23.

Planas, R., Carrillo, J., Sanchez, A., Ruiz de Villa, M.C., Nuñez, F., Verdaguer, J., James, R.F.L., Pujol-Borrell, R., and Vives-Pi, M. (2010). Gene expression profiles for the human pancreas and purified islets in Type 1 diabetes: new findings at clinical onset and in long-standing diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* *159*, 23–44.

Pociot, F., and Lernmark, Å. (2016). Genetic risk factors for type 1 diabetes. *Lancet* *387*, 2331–2339.

Protzek, A.O.P., Costa-Júnior, J.M., Rezende, L.F., Santos, G.J., Araújo, T.G., Vettorazzi, J.F., Ortis, F., Carneiro, E.M., Rafacho, A., and Boschero, A.C. (2014). Augmented  $\beta$ -Cell Function and Mass in Glucocorticoid-Treated Rodents Are

Associated with Increased Islet Ir-  $\beta$  /AKT/mTOR and Decreased AMPK/ACC and AS160 Signaling. *Int. J. Endocrinol.* 2014, 1–14.

Pugliese, A. (2017). Autoreactive T cells in type 1 diabetes. *J. Clin. Invest.* 127, 2881–2891.

Pujol-Autonell, I., Serracant-Prat, A., Cano-Sarabia, M., Ampudia, R.M., Rodriguez-Fernandez, S., Sanchez, A., Izquierdo, C., Stratmann, T., Puig-Domingo, M., MasPOCH, D., et al. (2015). Use of Autoantigen-Loaded Phosphatidylserine-Liposomes to Arrest Autoimmunity in Type 1 Diabetes. *PLoS One* 10, e0127057.

Qiu, Y., Li, D., He, X., Zhang, H., Li, J., Liang, S., and Hu, Y. (2006). [Effect of rapamycin and dexamethasone on differentiation and maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 22, 582–584.

Quinn, A., McInerney, M., Huffman, D., McInerney, B., Mayo, S., Haskins, K., and Sercarz, E. (2006). T cells to a dominant epitope of GAD65 express a public CDR3 motif. *Int. Immunol.* 18, 967–979.

Ramond, C., Berthault, C., Burlen-Defranoux, O., De Sousa, A.P., Guy-Grand, D., Vieira, P., Pereira, P., and Cumano, A. (2014). Two waves of distinct hematopoietic progenitor cells colonize the fetal thymus. *Nat. Immunol.* 15, 27–35.

Rasmussen, T., Witsø, E., Tapia, G., Stene, L.C., and Rønningen, K.S. (2011). Self-reported lower respiratory tract infections and development of islet autoimmunity in children with the type 1 diabetes high-risk HLA genotype: The MIDIA study. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 27, 834–837.

Ray, A., and Prefontaine, K.E. (1994). Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- $\kappa$ B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 752–756.

Redondo, M.J., Rewers, M., Yu, L., Garg, S., Pilcher, C.C., Elliott, R.B., and Eisenbarth, G.S. (1999). Genetic determination of islet cell autoimmunity in monozygotic twin, dizygotic twin, and non-twin siblings of patients with type 1 diabetes: prospective twin study. *BMJ* 318, 698–702.

Redondo, M.J., Yu, L., Hawa, M., Mackenzie, T., Pyke, D.A., Eisenbarth, G.S., and Leslie, R.D.G. (2001). Heterogeneity of Type I diabetes: Analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. *Diabetologia* 44, 354–362.

Redondo, M.J., Jeffrey, J., Fain, P.R., Eisenbarth, G.S., and Orban, T. (2008). Concordance for Islet Autoimmunity among Monozygotic Twins. *N. Engl. J. Med.* 359, 2849–2850.

Rewers, M., and Ludvigsson, J. (2016). Environmental risk factors for type 1 diabetes. *Lancet (London, England)* 387, 2340–2348.

Richardson, S.J., and Morgan, N.G. (2018). Enteroviral infections in the pathogenesis of type 1 diabetes: new insights for therapeutic intervention. *Curr.*

Opin. Pharmacol. 43, 11–19.

Richardson, S.J., Rodriguez-Calvo, T., Gerling, I.C., Mathews, C.E., Kaddis, J.S., Russell, M.A., Zeissler, M., Leete, P., Krogvold, L., Dahl-Jørgensen, K., et al. (2016). Islet cell hyperexpression of HLA class I antigens: a defining feature in type 1 diabetes. *Diabetologia* 59, 2448–2458.

Ring, A.M., Garland, J.S., Stafileil, B.R., Carr, M.H., Peckman, G.S., and Pircon, R.A. (2007). The effect of a prolonged time interval between antenatal corticosteroid administration and delivery on outcomes in preterm neonates: a cohort study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 196, 457.e1-457.e6.

Rosenbauer, J., Herzig, P., and Giani, G. (2008). Early infant feeding and risk of type 1 diabetes mellitus - A nationwide population-based case-control study in pre-school children. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 24, 211–222.

Rosenberg, G.A., Dencoff, J.E., Correa, N., Reiners, M., and Ford, C.C. (1996). Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: Relation to blood-brain barrier injury. *Neurology* 46, 1626–1632.

Rouillard, A.D., Gundersen, G.W., Fernandez, N.F., Wang, Z., Monteiro, C.D., McDermott, M.G., and Ma'ayan, A. (2016). The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database* 2016, baw100.

Ruocco, M.G., Chaouat, G., Florez, L., Bensussan, A., and Klatzmann, D. (2014). Regulatory T-Cells in Pregnancy: Historical Perspective, State of the Art, and Burning Questions. *Front. Immunol.* 5, 389.

Russell, R., Karzai, A.W., Mehl, A.F., and McMacken, R. (1999). DnaJ Dramatically Stimulates ATP Hydrolysis by DnaK: Insight into Targeting of Hsp70 Proteins to Polypeptide Substrates †. *Biochemistry* 38, 4165–4176.

Sachdeva, P., Patel, B., and Patel, B. (2009). Drug use in pregnancy; a point to ponder! *Indian J. Pharm. Sci.* 71, 1.

Samuelsson, U., Oikarinen, S., Hyöty, H., and Ludvigsson, J. (2011). Low zinc in drinking water is associated with the risk of type 1 diabetes in children. *Pediatr. Diabetes* 12, 156–164.

Sarukhanu, A., Gombert, J. -M, Olivi, M., Bach, J. -F, Carnaud, C., and Garchon, H. -J (1994). Anchored polymerase chain reaction based analysis of the V $\beta$  repertoire in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Eur. J. Immunol.* 24, 1750–1756.

Sato, T., Laver, J.H., Aiba, Y., and Ogawa, M. (1999). NK cell colony formation from human fetal thymocytes. *Exp. Hematol.* 27, 726–733.

Savinov, A., and Strongin, A. (2007). Defining the roles of T cell membrane proteinase and CD44 in type 1 diabetes. *IUBMB Life* 59, 6–13.

- Scheepens, A., van de Waarenbug, M., van den Hove, D., and Blanco, C.E. (2003). A single course of prenatal betamethasone in the rat alters postnatal brain cell proliferation but not apoptosis. *J. Physiol.* *552*, 163–175.
- Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* *182*, 311–322.
- Seckl, J.R. (2004). Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur. J. Endocrinol. Suppl.* *151*, 49–62.
- Shaltout, A.A., Wake, D., Thanaraj, T.A., Omar, D.M., Al-AbdulRazzaq, D., Channanath, A., AlKandari, H., Abdulrasoul, M., Miller, S., Conway, N., et al. (2017). Incidence of type 1 diabetes has doubled in Kuwaiti children 0-14 years over the last 20 years. *Pediatr. Diabetes* *18*, 761–766.
- Sharma, S., Pati, H.P., Ahuja, R.K., Takkar, D., and Kochupillai, V. (1997). Haemopoietic cell composition of human fetal liver, spleen and thymus. *Med. Oncol.* *14*, 99–101.
- Sheen, J.M., Hsieh, C.S., Tain, Y.L., Li, S.W., Yu, H.R., Chen, C.C., Tiao, M.M., Chen, Y.C., and Huang, L.T. (2016). Programming effects of prenatal glucocorticoid exposure with a postnatal high-fat diet in diabetes mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.
- Shih, H.P., Wang, A., and Sander, M. (2013). Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *29*, 81–105.
- Simpson, M., Brady, H., Yin, X., Seifert, J., Barriga, K., Hoffman, M., Bugawan, T., Barón, A.E., Sokol, R.J., Eisenbarth, G., et al. (2011). No association of vitamin D intake or 25-hydroxyvitamin D levels in childhood with risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes: The Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetologia* *54*, 2779–2788.
- Smets, I., Van Deun, L., Bohyn, C., van Pesch, V., Vanopdenbosch, L., Dive, D., Bissay, V., and Dubois, B. (2017). Corticosteroids in the management of acute multiple sclerosis exacerbations. *Acta Neurol. Belg.* *117*, 623–633.
- Söderström, U., Åman, J., and Hjern, A. (2012). Being born in Sweden increases the risk for type 1 diabetes - a study of migration of children to Sweden as a natural experiment. *Acta Paediatr.* *101*, 73–77.
- Solano, M.E., Holmes, M.C., Mittelstadt, P.R., Chapman, K.E., and Tolosa, E. (2016). Antenatal endogenous and exogenous glucocorticoids and their impact on immune ontogeny and long-term immunity. *Semin. Immunopathol.* *38*, 739–763.
- Soleimanpour, S.A., Gupta, A., Bakay, M., Ferrari, A.M., Groff, D.N., Fadista, J., Spruce, L.A., Kushner, J.A., Groop, L., Seeholzer, S.H., et al. (2014). The diabetes susceptibility gene *Clec16a* regulates mitophagy. *Cell* *157*, 1577–1590.
- Solomon, M., and Sarvetnick, N. (2004). The Pathogenesis of Diabetes in the NOD Mouse. *Adv. Immunol.* *84*, 239–264.

Soltesz, G., Patterson, C.C., and Dahlquist, G. (2007). Worldwide childhood type 1 diabetes incidence - What can we learn from epidemiology? *Pediatr. Diabetes* 8, 6–14.

Stahlhut, R.W., Myers, J.P., Taylor, J.A., Nadal, A., Dyer, J.A., and Vom Saal, F.S. (2018). Experimental BPA Exposure and Glucose-Stimulated Insulin Response in Adult Men and Women. *J. Endocr. Soc.* 2, 1173–1187.

Stene, L.C., and Gale, E.A.M. (2013). The prenatal environment and type 1 diabetes. *Diabetologia* 56, 1888–1897.

Stewart, C.J., Ajami, N.J., O'Brien, J.L., Hutchinson, D.S., Smith, D.P., Wong, M.C., Ross, M.C., Lloyd, R.E., Doddapaneni, H., Metcalf, G.A., et al. (2018). Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature* 562, 583–588.

Stiles, B.L., Kuralwalla-Martinez, C., Guo, W., Gregorian, C., Wang, Y., Tian, J., Magnuson, M.A., and Wu, H. (2006). Selective Deletion of Pten in Pancreatic Cells Leads to Increased Islet Mass and Resistance to STZ-Induced Diabetes. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2772–2781.

Stinchcombe, J.C., Bossi, G., Booth, S., and Griffiths, G.M. (2001). The Immunological Synapse of CTL Contains a Secretory Domain and Membrane Bridges. *Immunity* 15, 751–761.

Stocklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F., and Groner, B. (1996). Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* 383, 726–728.

Størdal, K., McArdle, H.J., Hayes, H., Tapia, G., Viken, M.K., Lund-Blix, N.A., Haugen, M., Joner, G., Skriverhaug, T., Mårild, K., et al. (2018). Prenatal iron exposure and childhood type 1 diabetes. *Sci. Rep.* 8, 1–11.

Strunk, T., Temming, P., Gembruch, U., Reiss, I., Bucsky, P., and Schultz, C. (2004). Differential maturation of the innate immune response in human fetuses. *Pediatr. Res.* 56, 219–226.

Stuart, M., and Bergstrom, L. (2011). Pregnancy and Multiple Sclerosis. *J Midwifery Womens Heal.* 56, 41–47.

Sun, J., Furio, L., Mecheri, R., van der Does, A.M., Lundeberg, E., Saveanu, L., Chen, Y., van Endert, P., Agerberth, B., and Diana, J. (2015). Pancreatic  $\beta$ -Cells Limit Autoimmune Diabetes via an Immunoregulatory Antimicrobial Peptide Expressed under the Influence of the Gut Microbiota. *Immunity* 43, 304–317.

Szablewski, L. (2014). Role of immune system in type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Int. Immunopharmacol.* 22, 182–191.

Teixeira, C.J., Santos-Silva, J.C., de Souza, D.N., Rafacho, A., Anhe, G.F., and Bordin, S. (2019). Dexamethasone during pregnancy impairs maternal pancreatic  $\beta$ -cell renewal during lactation. *Endocr. Connect.* 8, 120–131.

- Thomas, N.J., Jones, S.E., Weedon, M.N., Shields, B.M., Oram, R.A., and Hattersley, A.T. (2018). Frequency and phenotype of type 1 diabetes in the first six decades of life: a cross-sectional, genetically stratified survival analysis from UK Biobank. *Lancet Diabetes Endocrinol.* *6*, 122–129.
- Tian, X., Lin, Y., Cui, C., Su, M., and Lai, L. (2019). BTNL2-Ig Protein Attenuates Type 1 Diabetes in Non-Obese Diabetic (NOD) Mice. *Adv. Healthc. Mater.* *8*, 1800987.
- Toivonen, R., Arstila, T.P., and Hänninen, A. (2015). Islet-associated T-cell receptor- $\beta$  CDR sequence repertoire in prediabetic NOD mice reveals antigen-driven T-cell expansion and shared usage of V $\beta$ J $\beta$  TCR chains. *Mol. Immunol.* *64*, 127–135.
- Tomaszewska, E., and Dobrowolski, P. (2011). Prenatal glucocorticoids can programme postnatal development. *J. Pre-Clinical Clin. Res.* *5*, 21–26.
- Tracy, S., Drescher, K.M., Chapman, N.M., Kim, K.-S., Carson, S.D., Pirruccello, S., Lane, P.H., Romero, J.R., and Leser, J.S. (2002). Toward Testing the Hypothesis that Group B Coxsackieviruses (CVB) Trigger Insulin-Dependent Diabetes: Inoculating Nonobese Diabetic Mice with CVB Markedly Lowers Diabetes Incidence. *J. Virol.* *76*, 12097–12111.
- Tuomilehto, J. (2013). The Emerging Global Epidemic of Type 1 Diabetes. *Curr. Diab. Rep.* *13*, 795–804.
- Turner, J.D., Schote, A.B., Macedo, J.A., Pelascini, L.P.L., and Muller, C.P. (2006). Tissue specific glucocorticoid receptor expression, a role for alternative first exon usage? *Biochem. Pharmacol.* *72*, 1529–1537.
- Ueno, H., and Weissman, I.L. (2006). Clonal Analysis of Mouse Development Reveals a Polyclonal Origin for Yolk Sac Blood Islands. *Dev. Cell* *11*, 519–533.
- Ulmansky, R., Turjeman, K., Baru, M., Katzavian, G., Harel, M., Sigal, A., Naparstek, Y., and Barenholz, Y. (2012). Glucocorticoids in nano-liposomes administered intravenously and subcutaneously to adjuvant arthritis rats are superior to the free drugs in suppressing arthritis and inflammatory cytokines. *J. Control. Release* *160*, 299–305.
- Uusitalo, U., Lee, H.S., Aronsson, C.A., Vehik, K., Yang, J., Hummel, S., Silvis, K., Lernmark, Å., Rewers, M., Hagopian, W., et al. (2018). Early infant diet and islet autoimmunity in the TEDDY study. *Diabetes Care* *41*, 522–530.
- Vaarala, O., Jokinen, J., Lahdenkari, M., and Leino, T. (2017). Rotavirus Vaccination and the Risk of Celiac Disease or Type 1 Diabetes in Finnish Children at Early Life. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *36*, 674–675.
- Vatanen, T., Franzosa, E.A., Schwager, R., Tripathi, S., Arthur, T.D., Vehik, K., Lernmark, Å., Hagopian, W.A., Rewers, M.J., She, J.-X., et al. (2018). The human gut microbiome in early-onset type 1 diabetes from the TEDDY study. *Nature* *562*, 589–594.



Velardi, A., and Cooper, M.D. (1984). An immunofluorescence analysis of the ontogeny of myeloid, T, and B lineage cells in mouse hemopoietic tissues. *J. Immunol.* *133*, 672–677.

Villasenor, A., Chong, D.C., and Cleaver, O. (2008). Biphasic Ngn3 expression in the developing pancreas. *Dev. Dyn.* *237*, 3270–3279.

Virtanen, S.M., Takkinen, H.M., Nevalainen, J., Kronberg-Kippilä, C., Salmenhaara, M., Uusitalo, L., Kenward, M.G., Erkkola, M., Veijola, R., Simell, O., et al. (2011). Early introduction of root vegetables in infancy associated with advanced  $\beta$ -cell autoimmunity in young children with human leukocyte antigen-conferred susceptibility to Type 1 diabetes. *Diabet. Med.* *28*, 965–971.

Virtanen, S.M., Nevalainen, J., Kronberg-Kippilä, C., Ahonen, S., Tapanainen, H., Uusitalo, L., Takkinen, H.M., Niinistö, S., Ovaskainen, M.L., Kenward, M.G., et al. (2012). Food consumption and advanced  $\beta$  cell autoimmunity in young children with HLA-conferred susceptibility to type 1 diabetes: A nested case-control design. *Am. J. Clin. Nutr.* *95*, 471–478.

Viskari, H., Ludvigsson, J., Uibo, R., Salur, L., Marculionyte, D., Hermann, R., Soltesz, G., Füchtenbusch, M., Ziegler, A.G., Kondrashova, A., et al. (2005). Relationship between the incidence of type 1 diabetes and maternal enterovirus antibodies: Time trends and geographical variation. *Diabetologia* *48*, 1280–1287.

Viskari, H., Knip, M., Tauriainen, S., Huhtala, H., Veijola, R., Ilonen, J., Simell, O., Surcel, H.-M., and Hyoty, H. (2012). Maternal Enterovirus Infection as a Risk Factor for Type 1 Diabetes in the Exposed Offspring. *Diabetes Care* *35*, 1328–1332.

Vissers, W.H.P.M., Berends, M., Muys, L., van Erp, P.E.J., de Jong, E.M.G.J., and van de Kerkhof, P.C.M. (2004). The effect of the combination of calcipotriol and betamethasone dipropionate versus both monotherapies on epidermal proliferation, keratinization and T-cell subsets in chronic plaque psoriasis. *Exp. Dermatol.* *13*, 106–112.

Vives-Pi, M., Somoza, N., Fernandez-Alvarez, J., Vargas, F., Caro, P., Alba, A., Gomis, R., Labeta, M.O., and Pujol-Borrell, R. (2003). Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. *Clin. Exp. Immunol.* *133*, 208–218.

Vives-Pi, M., Rodríguez-Fernández, S., and Pujol-Autonell, I. (2015). How apoptotic  $\beta$ -cells direct immune response to tolerance or to autoimmune diabetes: a review. *Apoptosis* *20*, 263–272.

Wahlberg, J., Vaarala, O., and Ludvigsson, J. (2006). Dietary risk factors for the emergence of type 1 diabetes-related autoantibodies in 2½-year-old Swedish children. *Br. J. Nutr.* *95*, 603–608.

Wållberg, M., and Cooke, A. (2013). Immune mechanisms in type 1 diabetes.

Trends Immunol. 34, 583–591.

Waltl, E.E., Selb, R., Eckl-Dorna, J., Mueller, C.A., Cabauatan, C.R., Eiwegger, T., Resch-Marat, Y., Niespodziana, K., Vrtala, S., Valenta, R., et al. (2018). Betamethasone prevents human rhinovirus- and cigarette smoke- induced loss of respiratory epithelial barrier function. *Sci. Rep.* 8, 9688.

Wang, C.-J., Chou, F.-C., Chu, C.-H., Wu, J.-C., Lin, S.-H., Chang, D.-M., and Sytwu, H.-K. (2008). Protective role of programmed death 1 ligand 1 (PD-L1) in nonobese diabetic mice: the paradox in transgenic models. *Diabetes* 57, 1861–1869.

Weber, P.S.D. (2003). Mechanisms of glucocorticoid-induced down-regulation of neutrophil L-selectin in cattle: evidence for effects at the gene-expression level and primarily on blood neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 75, 815–827.

Weiss, L., Slavin, S., Reich, S., Cohen, P., Shuster, S., Stern, R., Kaganovsky, E., Okon, E., Rubinstein, A.M., and Naor, D. (2000). Induction of resistance to diabetes in non-obese diabetic mice by targeting CD44 with a specific monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 285–290.

van Well, G.T.J., Daalderop, L.A., Wolfs, T., and Kramer, B.W. (2017). Human perinatal immunity in physiological conditions and during infection. *Mol. Cell. Pediatr.* 4, 4.

Wen, X., and Yang, Y. (2017). Emerging roles of GLIS3 in neonatal diabetes, type 1 and type 2 diabetes. *J. Mol. Endocrinol.* 58, R73–R85.

Williams, A.J.K., Krug, J., Lampeter, E.F., Mansfield, K., Beales, P.E., Signore, A., Gale, E.A.M., and Pozzilli, P. (1990). Raised temperature reduces the incidence of diabetes in the NOD mouse. *Diabetologia* 33, 635–637.

Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555–556.

Xia, Y., Xie, Z., Huang, G., and Zhou, Z. (2019). Incidence and trend of type 1 diabetes and the underlying environmental determinants. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 35, e3075.

Xiao, C., Puddicombe, S.M., Field, S., Haywood, J., Broughton-Head, V., Puxeddu, I., Haitchi, H.M., Vernon-Wilson, E., Sammut, D., Bedke, N., et al. (2011). Defective epithelial barrier function in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128, 549–556.e12.

Xiao, X., Gaffar, I., Guo, P., Wiersch, J., Fischbach, S., Peirish, L., Song, Z., El-Gohary, Y., Prasad, K., Shiota, C., et al. (2014). M2 macrophages promote beta-cell proliferation by up-regulation of SMAD7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E1211–20.

Xu, H., Dai, Q., Xu, Y., Gong, Z., Dai, G., Ding, M., Duggan, C., Hu, Z., and Hu, F.B. (2015). Time trends and risk factor associated with premature birth and infants deaths due to prematurity in Hubei Province, China from 2001 to 2012. *BMC*

Pregnancy Childbirth 15, 329.

Yan, J.M., Huang, H., Li, Q.Q., and Deng, X.Y. (2018). A single-center study on the incidence and mortality of preterm infants from 2006 to 2016. *Chinese J. Contemp. Pediatr.* 20, 368–372.

Yawn, B.P. (2008). Factors accounting for asthma variability: Achieving optimal symptom control for individual patients. *Prim. Care Respir. J.* 17, 138–147.

Yeung, W.-C.G., Rawlinson, W.D., and Craig, M.E. (2011). Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ* 342, d35.

Ygberg, S., and Nilsson, A. (2012). The developing immune system - From foetus to toddler. *Acta Paediatr. Int. J. Paediatr.* 101, 120–127.

Zaccone, P., Burton, O., Miller, N., Jones, F.M., Dunne, D.W., and Cooke, A. (2009). *Schistosoma mansoni* egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice. *Eur. J. Immunol.* 39, 1098–1107.

Zaharie, D., Moleriu, R.D., and Mic, F.A. (2016). Modeling the development of the post-natal mouse thymus in the absence of bone marrow progenitors. *Sci. Rep.* 6, 1–13.

Zannas, A.S., and Chrousos, G.P. (2017). Epigenetic programming by stress and glucocorticoids along the human lifespan. *Mol. Psychiatry* 22, 640–646.

Zhang, Z., Jones, S., Hagood, J.S., Fuentes, N.L., and Fuller, G.M. (1997). STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 272, 30607–30610.

Zhao, Y., Shen, X.-F., Cao, K., Ding, J., Kang, X., Guan, W., Ding, Y., Liu, B., and Du, J.-F. (2018). Dexamethasone-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells Prolong Allo Cardiac Graft Survival through iNOS- and Glucocorticoid Receptor-Dependent Mechanism. *Front. Immunol.* 9, 282.

Zheng, Y., Sun, L., Jiang, T., Zhang, D., He, D., and Nie, H. (2014). TNF  $\alpha$  Promotes Th17 Cell Differentiation through IL-6 and IL-1  $\beta$  Produced by Monocytes in Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol. Res.* 2014, 1–12.

Ziegler, A.G., Schmid, S., Huber, D., Hummel, M., and Bonifacio, E. (2003). Early Infant Feeding and Risk of Developing Type 1 Diabetes-Associated Autoantibodies. *J. Am. Med. Assoc.* 290, 1721–1728.

Ziegler, A.G., Rewers, M., Simell, O., Simell, T., Lempainen, J., Steck, A., Winkler, C., Ilonen, J., Veijola, R., Knip, M., et al. (2013). Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 309, 2473–2479.

Ziegler, R., Alper, C.A., Awdeh, Z.L., Castano, L., Brink, S.J., Soeldner, J.S., Jackson,

R.A., and Eisenbarth, G.S. (1991). Specific association of HLA-DR4 with increased prevalence and level of insulin autoantibodies in first-degree relatives of patients with type I diabetes. *Diabetes* 40, 709–714.



# 11. Agraïments

El temps passa volant i quan te n'adones et veus explicant batalletes als nous estudiants de pràctiques i recordant els moments viscuts al laboratori. Sembla ahir quant vaig escalar la pujada des de l'estació de busos fins a l'IGTP més nerviós i més tens del que em podia imaginar. Mai m'hauria imaginat que em trobaria un equip de magnífiques persones amb una paciència extrema i que m'ajudarien tant durant la meva estada en aquest laboratori.

Marta, moltíssimes gràcies. M'has guiat de forma excel·lent en aquest llarg camí. T'agraeixo molt l'oportunitat que em vas donar i com sempre has cregut en mi.

Silvia, ets la millor companya de laboratori que podria haver imaginat. Sempre a punt per donar-me un cop de mà. Moltes gràcies per la teva paciència i per tota la teva ajuda

Irma, moltes gràcies per tot el que em vas ensenyar. Tu em vas marcar el camí a seguir en aquesta tesi.

Rosa, sense tu aquesta tesi no existiria. Tot el que em vas ensenyar sobre ratolins, mai me n'oblidaré. Moltes gràcies.

Adrián, moltes gràcies pels bons moments i per la teva paciència amb les immunofluorescències; algun dia em sortiran bé.

Clara Erhenberg, it was fun to have you here, thanks for your help

Laia, pel poc temps que et conec m'has donat bastanta guerra, moltes gràcies per la teva ajuda.

A la Doctora Eva Tolosa del departament d'Immunologia de la Universitat d'Hamburg-Eppendorf, moltes gràcies. Tu vas començar aquesta aventura i estic molt agraït per haver-me confiat aquest projecte i per haver conegut una ment tan brillant com la teva.

Anna Gieras, thanks a lot for all the help you gave me in this project, thanks for your kindness and for your warm welcome in Hamburg.

Arnau, gràcies per acollir-me tan càlidament a Hamburg and thanks to all the members of Eva's Lab to help me during my short stage on Hamburg.

A la cap del Servei d'immunologia de l'hospital Germans Trias i Pujol, la Doctora Eva Martínez Cáceres, moltes gràcies per acollir-me al laboratori i per promoure la discussió dels coneixements de tot el grup.

Moltes gràcies a tot el grup d'esclerosis múltiple i estudiants, María José, Juan, Aleix, Alícia, Ares, Neus, Ferran i Coral. Ha sigut un plaer compartir la sala de cultius amb vosaltres.

Als tècnics i facultatius del Servei d'Immunologia, Bibiana, Aina, Joan, Clara, Yolanda, Jorge, Alex, Amanda, Aroa, Maria, Armando, Ariadna, Ana, Patricia, Lucas i Ana Belen. Moltes gràcies per sempre estar disposats a ajudar en el que faci falta

Al director de l'institut de Recerca Germans Trias i Pujol, el Doctor Manel Puig Domingo, moltes gràcies per tota l'ajuda que has brindat al nostre grup.

Moltes gràcies als companys de l'IGTP, a poc a poc el doctorat s'acaba. Moltes gràcies especialment a tu Marta Monguió, que sempre has estat allà per resoldre els meus dubtes.

Al Servei de Citometria, Marco i Gerard, moltes gràcies per la vostra ajuda amb totes les complicacions que he tingut.

Al Servei de Genòmica, Pilar, Ana i Irina. Gràcies per tots els consells que em va donar amb les PCR.

Moltes gràcies al Servei de Pediatria de l'Hospital Germans Trias i Pujol, Doctor Joan Bel, Doctora Marta Murillo i Nati Real, sou uns grans professionals.

Moltes gràcies al Servei d'Endocrinologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol, Doctor Federico Vázquez i Doctora Eva Aguilera, és un plaer poder treballar amb vosaltres.

Moltes gràcies al personal de l'estabulari, Lino, Yaiza i Jorge, va fer més entretingudes les visites al CEA.

Moltes gràcies a la gent de recepció, Emi i Maribel, el vostre somriure sempre alegra el matí.

Moltes gràcies Deborah Cullell-Young per corregir els nostres articles.

Moltes gràcies a tota la família Navalpotro-Cardús, la vostra ajuda ha sigut indispensable per a aquest projecte i per al grup. Marina, espero que t'ho passessis bé amb nosaltres, gràcies per venir al nostre grup.

Moltes gràcies a la Sra Anna Duran, responsable de Fundraising IGTP i Amics de Can Ruti (<https://www.amicsdecanruti.org/es/>), per la teva amabilitat i el teu esforç per ajudar als científics.

Gràcies a la Fundació DTO. Seguiu així, sou l'esperança per a milers de famílies amb gent que té DT1; entre tots trobarem la solució, no ho dubteu.

Als meus amics d'Hospitalet, Jordi Exposito, Joan, Aitor, Jaume Caparros, Jaume Pérez, Toni, Joan Piera, Yaiza, gràcies per tots els moments junts i per la vostra amistat.

Als companys del club, Eduard, Alejandro, Xavi, Xavier, Eva, Albert, Luís, Dani, Eric, Sara, Joan i Asif, va ser molt divertit poder compartir amb vosaltres la meva afició per la cultura japonesa, moltes gràcies.

A la gent de Wa Rei Ryu, Paco, Joaquin, Dani, Paolo, Tonetti, Oscar, Marina, Edu, Marcelo i tots els membres que han passat durant els 8 anys que he estat amb vosaltres, moltes gràcies, sou una gran família d'artistes marciais.

Moltes gràcies a l'Agustín, el Javier, l'Angel, el Miguel Angel i l'Abraham pels divendres de *Battletech*.

Moltes gràcies a l'Aroa, el Mauro i tota la gent de "*Whatevah*" van ser moltes hores i molt divertides pels mons d'*Azeroth* que han forjat una gran amistat.

Moltes gràcies al meu cunyat Dani per sempre poder parlar de qualsevol cosa amb tu. Moltes gràcies a la família Perella i als amics de Barbastro.

Moltes gràcies a tota la meva família, que sempre està quan la necessites; encara que cadascú vagi per un camí sempre hi ha algun punt comú de trobada. Seguiu així i no perdem mai el contacte.

Als meus nebots, Enzo i Mila, creixeu forts i demostreu al món de què esteu fets.



A la meva germana, Belén. Sempre has sigut el meu model a seguir, per això mai et posis límits; tens la força per aconseguir tot el que et proposis, encara que tu no t'ho creguis. Sempre t'ajudaré quan et faci falta. Moltes gràcies per ser tan bona germana.

Núria, gràcies per compartir aquest llarg camí amb mi, gràcies per donar-li un toc especial a la meva simple vida. Espero poder compartir el mateix camí durant molts anys. Moltes gràcies al Lluís i a la Mercè per obrir-me tan càlidament les portes de casa vostra.

Als meus pares, Sisco i Rosana. Sense vosaltres no hauria pogut arribar fins aquí, sempre heu estat darrer meu ajudant en les petites coses, que sense jo adonar-me m'heu fet més de mil favors. Moltes gràcies per tot.