

NOTA TÉCNICA

El caseinato de sodio incrementa número de linfocitos B en ratones.

Vanihamín Domínguez-Meléndez¹, Itzen Aguiñiga-Sánchez², Leticia Moreno-Fierros³,
Beatriz Torres¹, Edelmiro Santiago Osorio¹

¹ Centro de Estudios y Servicios en Salud, Universidad Veracruzana, Veracruz, México

² Unidad Multidisciplinaria de Investigación, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

³ Unidad de Investigación en Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, México

Introducción. El caseinato de sodio, una sal de la caseína utilizada como agente proinflamatorio en ratones, es capaz de inducir granulopoyesis *in vivo* e incrementar la producción de citocinas esenciales en dicho evento.

Objetivo. Evaluar si el caseinato de sodio es capaz de inducir un efecto biológico en células de origen linfóide y la producción de citocinas involucradas con este linaje.

Materiales y métodos: Se utilizaron ratones hembra BALB/c de 8 a 12 semanas de edad. Los animales se inyectaron cuatro veces, con intervalos de 48 horas, por vía intraperitoneal con 1 ml de caseinato de sodio (10 % de SFB p/v). La población de linfocitos B y la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) se analizaron mediante citometría de flujo. La detección de la interleucina 7 se evaluó mediante la técnica de ELISA.

Resultados. Tras la inyección por vía intraperitoneal, el número de linfocitos B 220+ provenientes del bazo de ratones tratados con caseinato de sodio aumentó comparados con los que solo recibieron el vehículo como tratamiento (89,01±1,03 Vs. 75,66±2,08), así como la incorporación de BrdU en células B220+ (38,59±4,48 Vs. 11,82±1,04). Se evidenció, asimismo, el incremento en la concentración de la interleucina 7 (IL-7) en el suero de los ratones tratados con caseinato de sodio, comparados con los que solo recibieron el vehículo (62,1±17,5 Vs. 26,9±4,4 pg/ml).

Conclusión. El caseinato de sodio fue capaz de aumentar el número de linfocitos B en bazo de ratones, así como inducir la producción de IL-7, citocina clave para la linfopoyesis B.

Palabras clave: linfocitos B; proliferación de la célula; inflamación; citosina; citometría de flujo; ensayo de inmunoadsorción enzimática.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3604>

Sodium caseinate increases the number of B lymphocytes in mouse.

Introduction: Sodium caseinate, a casein salt, is a proinflammatory agent in mice, and it is able to induce granulopoiesis *in vivo* and to increase the production of cytokines, which is key for this biological process.

Objective: To assess whether sodium caseinate is able to induce a biological effect on cells from lymphoid origin and the production of cytokines involved in this lineage *in vivo*.

Materials and methods: We used female BALB /c mice from 8 to 12 weeks old. The animals were injected intraperitoneally (IP) with 1 ml of sodium caseinate (10% PBS w/v) four times every 48 hours. The B cell populations and the incorporation of BrdU were analyzed by flow cytometry. Detection of interleukin-7 was assessed by ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Results: We established that after intraperitoneal injection, the number of B lymphocytes 220+ from the spleen of mice treated with sodium caseinate increased compared to those that only received the vehicle (89.01±1.03 vs 75.66 ± 2.08), and the same was observed with the incorporation of BrdU in B220 + cells (38.59±4.48 vs 11.82±1.04 respectively). We also established that the concentration of interleukin-7 (IL-7) in the serum of mice treated with sodium caseinate increased compared to those that only received the vehicle (62.1 ± 17.5 vs 26.9 ± 4.4 pg/ml).

Contribución de los autores:

Vanihamín Domínguez: trabajo experimental en citometría de flujo, obtención de muestras biológicas para el análisis mediante la técnica de ELISA, análisis de datos y escritura del manuscrito

Itzen Aguiñiga: técnicas de ELISA para detección de la citocina IL-7 y manejo de datos

Leticia Moreno: asesoría en la estandarización de la técnica utilizada en la citometría de flujo y análisis de los resultados

Beatriz Torres y Edelmiro Santiago: análisis de resultados y redacción del manuscrito

Todos los autores participaron en la revisión final del manuscrito.

Conclusion: Sodium caseinate was able to increase the number of B lymphocytes in the spleen; it also induced IL-7 production, a cytokine that is key for the B cell lymphopoiesis.

Key words: B-lymphocytes; cell proliferation; inflammation; cytosine; flow cytometry; enzyme-linked immunosorbent assay.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3604>

El caseinato de sodio, una sal de la caseína y principal proteína de la leche, se ha utilizado como agente proinflamatorio desde hace más de 20 años; se ha demostrado que es capaz de inducir migración de granulocitos, macrófagos y linfocitos en el sitio de inyección cuando es administrado por vía intraperitoneal en ratones (1,2).

En un estudio se reportó que el caseinato de sodio indujo la producción del factor estimulante de colonias de macrófagos (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*, M-CSF) *in vitro* (3). Se ha demostrado, también, que la administración por vía intraperitoneal de caseinato de sodio en un modelo de ratón leucémico, incrementa su porcentaje de supervivencia (4), y que, tras la inyección del caseinato, este es capaz de movilizar células madre hematopoyéticas a la sangre periférica en el ratón (5).

Nuestro grupo de trabajo demostró que, mediante la inyección de caseinato de sodio, se induce la granulopoyesis en médula ósea, y se incrementan los niveles séricos del factor estimulante de colonias de granulocitos (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*, G-CSF) y del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF) (6). El caseinato de sodio es un agente proinflamatorio capaz de actuar sobre células de origen hematopoyético y, también, incrementa las concentraciones de citocinas con un rol fundamental en la mielopoyesis (7).

Por otra parte, la administración de péptidos de b-caseína a cultivos de linfocitos de carnero incrementa la proliferación de linfocitos B (8) e induce la proliferación de las células B provenientes del bazo *in vitro* (9), sugiere que el caseinato de sodio podría modular la proliferación de este linaje celular.

En este estudio, se analizó el posible efecto del caseinato de sodio sobre los linfocitos B en la médula ósea y en el bazo. Con este propósito, se evaluó si su inyección por vía intraperitoneal incrementaba el número de linfocitos en estos órganos, así como la concentración sérica de la IL-7, citocina clave para la linfopoyesis en ratones (10-12).

Materiales y métodos

Los ratones hembra BALB/c de 8 a 12 semanas de edad se mantuvieron bajo condiciones estériles y se alimentaron *ad libitum*. Se dividieron en tres grupos conformados por cinco ratones cada uno: el grupo de control, que no recibía tratamiento; el grupo al que se le administraba solo 1 ml de suero fetal bovino (SFB) (vehículo), y el grupo en tratamiento, que recibía 0,1 g de caseinato de sodio en 1 ml de SFB al 10 % (p/v). Los de este último grupo, se inyectaron cuatro veces, con intervalos de 48 horas, por vía intraperitoneal. Los ratones fueron sacrificados a las 24 horas de la última inyección mediante dislocación cervical para obtener las células.

Obtención de células mononucleares de médula ósea

Después del sacrificio de los ratones, se obtuvieron los fémures en una campana de cultivo previamente desinfectada con alcohol al 70 % y esterilizada durante 20 minutos con luz ultravioleta (UV). Los fémures se colocaron en cajas de Petri con medio de Iscove. Posteriormente, se cortaron las epífisis de cada fémur de los dos grupos, evitando que se astillaran y, con una jeringa de insulina de 1 ml con medio de Iscove con suplemento de suero bovino fetal (SBF) al 10 % (p/v), se extrajeron las células totales de la médula ósea.

La suspensión celular se centrifugó para obtener los botones celulares de cada grupo, los cuales se colocaron cuidadosamente en tubos cónicos con un gradiente de densidad a base de Ficoll® (1,077 g/L, Sigma, México) y se centrifugaron por 20 minutos a 500g para obtener las células mononucleares (CMN). Por último, estas se lavaron tres veces con medio de Iscove y SBF al 10 % para su posterior análisis.

Correspondencia:

Edelmiro Santiago Osorio, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Batalla 5 de mayo s/n, esquina fuerte de Loreto, Col. Ejército de Oriente, Iztapalapa, C.P. 09230, Ciudad de México, México
Teléfono: (0155) 5623 0791
edelmiros@yahoo.com

Recibido: 04/10/16; aceptado: 22/02/17

Obtención de células mononucleares de bazo

Los bazos se envolvieron en un filtro, se depositaron en cajas de Petri con 4 ml de medio de Iscove, y se exprimieron con un émbolo de jeringa hasta liberar las células sanguíneas. La suspensión celular se centrifugó para obtener el botón celular de cada grupo, el cual se colocó en tubos con 2 ml de medio de Iscove y SFB al 10 %. Posteriormente, las células obtenidas se depositaron en tubos cónicos con gradiente de densidad para obtener las células mononucleares, de la misma manera que las de médula ósea. Al finalizar este procedimiento, se obtuvo un anillo celular de cada muestra que contenía las células mononucleares, las cuales se lavaron dos veces con medio de Iscove y SFB al 10 % y, por último, se contaron.

Ensayos de proliferación mediante citometría de flujo

Para los ensayos de proliferación, tan solo se consideraron el grupo de control, que recibió el vehículo, y el de estudio, tratado con caseinato de sodio. Después de administrarles el vehículo o el caseinato de sodio, los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal con bromodeoxiuridina (2 mg de BrdU por animal) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) y se sacrificaron a las 24 horas de la última dosis.

Las células mononucleares se obtuvieron de la médula ósea y el bazo mediante gradiente de densidad con Ficoll® (1,077 g/L) (Sigma, México). Posteriormente, la densidad celular se ajustó a 2×10^6 en 1 ml de SFB y las células se tiñeron con anti-B220 marcado con Cy5 para el linaje linfocitario B. Se requirieron 50.000 células por muestra para cada análisis.

Para detectar la proliferación del linaje, las células se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con anti-BrdU marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), según el protocolo del manual de procedimiento del estuche de BrdU para citometría de flujo (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) (6). Al finalizar la tinción, las células se volvieron a suspender en 0,3 ml de paraformaldehído al 1 % en SFB.

Los análisis del fenotipo celular y la incorporación de BrdU se hicieron en un citómetro FACS Calibur™ (Becton Dickinson, San José, CA, USA) con el programa Pro v.5.1.1 BD (Becton Dickinson), según las instrucciones del manual de procedimientos.

Detección de citocinas

Para detectar la interleucina IL-7, se obtuvo sangre fresca del plexo axilar de los ratones tratados y de los no tratados con caseinato de sodio. Una vez obtenida la sangre de los ratones, se centrifugó durante 10 minutos a 1.500 rpm para obtener el suero. Posteriormente, se evaluó la concentración de IL-7 en el suero, respetando el procedimiento del kit de ELISA (Mouse Interleukin 7, Immunoassay, R&D Systems, MN, USA) durante las dos horas posteriores al sacrificio (6). La lectura de las placas se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro Tecan (Tecan Spectra, Austria).

Análisis estadístico

En el presente estudio los datos se presentaron como la media y la desviación estándar de los obtenidos de manera independiente, por lo menos, de tres experimentos. Para detectar las diferencias significativas entre los datos, se empleó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnett ($p < 0,05$) mediante el paquete estadístico SPSS®.

Autorización del comité de ética para la experimentación en animales

Los ratones se mantuvieron en condiciones estériles en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética de dicha Facultad (número FESZ/DEPI/CI/128/14), y se ajustaron a las leyes y normas mexicanas para el trato y la protección de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) (13).

Resultados

El caseinato de sodio disminuyó la incorporación de BrdU en linfocitos B de la médula ósea.

Para establecer si el caseinato de sodio influía en los linfocitos B, se evaluaron mediante citometría de flujo la granularidad, el tamaño y, posteriormente, la positividad frente al anticuerpo específico de linaje B, el anti-B220; asimismo, se utilizó el BrdU para evaluar la proliferación tras la inyección intraperitoneal del caseinato. Los resultados mostraron que el número de linfocitos en la médula ósea disminuyó en los ratones que recibieron caseinato de sodio, en comparación con los que solo recibieron el vehículo ($11,33 \pm 1,15$ Vs. $18,66 \pm 2,08$) (figura 1, A y B). También, se observó que el porcentaje de incorporación de BrdU disminuyó ($32,03 \pm 2,64$ Vs. $50,33 \pm 4,50$) (figura 1C).

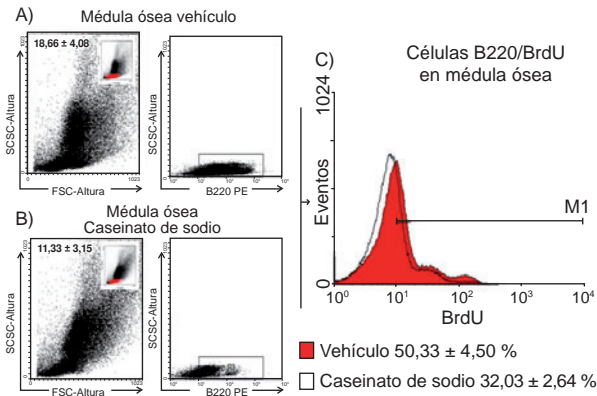


Figura 1. A y B. La inyección intraperitoneal con caseinato de sodio disminuyó el porcentaje de células correspondiente al linaje linfóide en médula ósea, así como la incorporación de BrdU. Se presentan diagramas de puntos representativos de células mononucleares totales provenientes de ratones tratados solo con el vehículo o con caseinato de sodio. La selección se hizo mediante la evaluación de la granularidad y el tamaño de la región correspondiente al linaje linfóide, y la positividad frente al anticuerpo B220 de células seleccionadas previamente de la región correspondiente al linaje. **C.** Evaluación del porcentaje de incorporación de BrdU en células B220 positivas provenientes de células mononucleares de médula ósea de ratones tratados con caseinato de sodio y de ratones no tratados con este. Los números representan el porcentaje de BrdU incorporado en las células \pm desviación estándar (DE) (de la marca M1). Los datos corresponden a, por lo menos, tres experimentos realizados de manera independiente, con tres ratones cada uno.

El caseinato de sodio aumentó la incorporación de BrdU en linfocitos B del bazo.

Se sabe que en los ratones el bazo es un órgano hematopoyético secundario capaz de sostener la hematopoyesis (14-16), por lo que se evaluó si el caseinato de sodio tenía algún efecto sobre los linfocitos B. Los resultados demostraron que el número de células correspondiente a la región de los linfocitos se incrementaba en los ratones que habían recibido el caseinato, en comparación con los que solo recibieron el vehículo (89,01 \pm 1,03 Vs. 75,66 \pm 2,08) (figura 2 A y B), Asimismo, se observó un incremento en la incorporación de BrdU en estas células (38,59 \pm 4,48 Vs. 11,82 \pm 1,04) (figura 2 C).

El caseinato de sodio aumentó la concentración de IL-7 en suero.

Una citocina clave en la linfopoyesis B del ratón es la IL-7 (10,17,18), por lo cual se evaluó su concentración en el suero de los ratones tratados con caseinato de sodio y de los no tratados. Los resultados mostraron que la concentración de IL-7 aumentó considerablemente en el suero de los ratones tratados con el caseinato, comparados con los que solo recibieron el vehículo (62,1 \pm 17,5 Vs. 26,9 \pm 4,4).

Discusión

La caseína, principal proteína de la leche, y su sal, el caseinato de sodio, han servido como modelos de agentes proinflamatorios al inyectarlos por vía intraperitoneal, desde hace más de 20 años (1,2,7). Se ha demostrado que promueven la migración de granulocitos, monocitos y linfocitos en el sitio de inyección y que incrementan la concentración de las citocinas que influyen en la mielopoyesis, como GM-CSF, M-CSF y G-CSF en suero y exudado de la cavidad peritoneal (1,7).

En otro estudio, se demostró que el caseinato de sodio en células de origen mieloide, como los granulocitos, induce la producción de M-CSF *in vitro* (3). Se ha observado que, tras su inyección, también aumenta la migración de células madre hematopoyéticas a sangre periférica (4) y que, además, los péptidos de la caseína inducen la proliferación de linfocitos B *in vitro* (8).

En nuestro grupo de trabajo se ha podido demostrar que la administración intraperitoneal de caseinato de sodio induce la granulopoyesis *in vivo* e incrementa el G-CSF y el GM-CSF en suero (6).

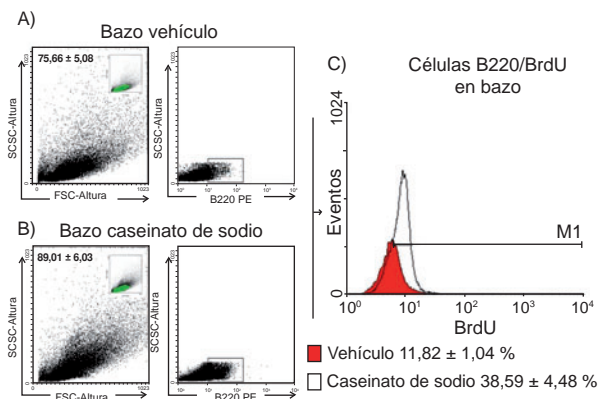


Figura 2 A y B. El tratamiento intraperitoneal con caseinato de sodio aumentó el porcentaje de células correspondiente al linaje linfóide en bazo, así como la incorporación de BrdU. Se presentan los diagramas de puntos representativos de las células mononucleares totales provenientes de ratones tratados solo con el vehículo y de aquellos tratados con caseinato de sodio. La selección se hizo mediante la evaluación de la granularidad y el tamaño de la región correspondiente al linaje linfóide y de la positividad frente al anticuerpo B220 de las células seleccionadas previamente de la región correspondiente al linaje. **C.** Evaluación del porcentaje de incorporación de BrdU en células B220 positivas provenientes de células mononucleares de bazo de ratones tratados con caseinato de sodio y de aquellos que no fueron tratados. Los números representan el porcentaje de BrdU incorporado en las células \pm desviación estándar (DE) (de la marca M1). Los datos presentados corresponden, por lo menos, a tres experimentos realizados de manera independiente con tres ratones cada uno.

En este estudio se demostró que, tras la inyección de 1 ml de caseinato de sodio (10 % p/v en SFB) cada 48 horas durante seis días, el número de linfocitos B en la médula ósea disminuyó, en tanto que, en el bazo, aumentó.

Este efecto concuerda con los resultados publicados por el grupo de Ueda, *et al.*, quienes demostraron que, en un proceso inflamatorio, el aumento de la proliferación se presenta principalmente en el linaje de los granulocitos, lo cual influye en la disminución de linfocitos B en este órgano (19,20).

Por otro lado, en este trabajo se observó que, si bien el número de linfocitos B en médula ósea disminuía (figura 1 A y B), se incrementaba en el bazo (figura 2 A y B), y no solo eso, pues también aumentó el porcentaje de incorporación de BrdU en los linfocitos B, lo cual podría ser indicativo de proliferación (figura 2 C) y concuerda con lo observado *in vivo* (8,9). También, se sabe que las citocinas son fundamentales para la generación de células de origen hematopoyético; tal es el caso de la IL-7, la cual tiene un papel fundamental en la linfopoyesis de células B (11,12,18).

En el presente estudio, se demostró que la concentración de IL-7 se elevó en el suero de los ratones tratados con caseinato de sodio, en comparación con el de aquellos que solo recibieron el vehículo. Previamente, nuestro grupo de trabajo había reportado que, después de la inyección intraperitoneal de caseinato de sodio, se promovía la granulopoyesis en la médula ósea, y los resultados obtenidos en este estudio sugieren que, tras la granulopoyesis generada por el caseinato, los linfocitos B posiblemente migran al bazo y allí proliferan, ya que en este órgano dicho evento ocurre de manera natural en ratones, con lo cual se mantiene la homeostasis inmunológica (14,21), y se ha demostrado que, tras la activación de la médula ósea, esta induce la migración al bazo de células madre multipotenciales con capacidad proliferativa (22,23), evento que pudiera verse favorecido por el incremento en la concentración de G-CSF y de IL-7 después de la inyección intraperitoneal del caseinato de sodio.

Agradecimientos

A Oswaldo Silvestre Santana, por la asistencia técnica en los experimentos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

Financiación

Este trabajo se hizo con el apoyo del programa de PAPIIT (IN217407, IN225610, IN220814) de la Universidad Nacional Autónoma de México, y con la beca escolar de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Referencias

1. Lotem J, Sachs L. Control of *in vivo* differentiation of myeloid leukemic cells. *Leukemia*. 1988;2:24s-37s.
2. Lotem J, Sachs L. Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation inducing proteins: *In vivo* regulation by compounds that induce inflammation. *Int J Cancer*. 1985;35:93-100.
3. Santiago-Osorio E, Mora L, Bautista M, Montesinos JJ, Martínez I, Ramos-Mandujano G, *et al.* Sodium caseinate induces secretion of macrophage colony-stimulating factor from neutrophils. *Immunobiology*. 2010;215:332-9. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.03.003>
4. Córdova-Galaviz Y, Ledesma-Martínez E, Aguiñiga-Sánchez I, Soldevila-Melgarejo G, Soto-Cruz I, Weiss-Steider B, *et al.* Sodium caseinate induces increased survival in leukaemic mouse J774 model. *In Vivo*. 2014;28: 819-25.
5. Santiago-Osorio E, Ledesma-Martínez E, Aguiñiga-Sánchez I, Poblano-Pérez I, Weiss-Steider B, Montesinos-Montesinos JJ, *et al.* Sodium caseinate (CasNa) induces mobilization of hematopoietic stem cells in a BALB/c mouse model. *Med Sci Monit Basic Res*. 2015;21:206-12. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.895442>
6. Domínguez-Meléndez V, Silvestre-Santana O, Moreno-Fierros L, Aguiñiga-Sánchez I, Martínez L, Marroquín-Segura R, *et al.* Sodium caseinate induces mouse granulopoiesis. *Inflamm Res*. 2012;61:367-73. <https://doi.org/10.1007/s00011-011-0421-7>
7. Metcalf D, Robb L, Dunn AR, Mifsud S, Di Rago L. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. *Blood*. 1996;88:3755-64.
8. Wong CW, Seow HF, Liu AH, Husband AJ, Smithers GW, Watson DL. Modulation of immune responses by bovine beta-casein. *Immunol Cell Biol*. 1996;74:323-9. <https://doi.org/10.1038/icb.1996.58>
9. Tobita K, Kawahara T, Otani H. Bovine beta-casein (1-28), a casein phosphopeptide, enhances proliferation and IL-6 expression of mouse CD19+ cells via Toll-like receptor 4. *J Agric Food Chem*. 2006;54:8013-7. <https://doi.org/10.1021/jf0610864>
10. Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:657-79. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090727>
11. Sitnicka E, Bryder D, Theilgaard-Mönch K, Buza-Vidas N, Adolfsson J, Jacobsen SE. Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity*. 2002;17:463-72. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00419-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00419-3)

12. **Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, *et al.*** Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med.* 1994;180:1955-60. <https://doi.org/10.1084/jem.180.5.1955>
13. **Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.** Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Fecha de consulta: 15 de enero de 2010. Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/bioterio.NOM-062.pdf>
14. **Bertrand JY, Giroux S, Golub R, Klaine M, Jalil A, Boucontet L, *et al.*** Characterization of purified intra-embryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:134-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402270102>
15. **Cyster JG.** Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:127-59. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115628>
16. **Fu YX, Chaplin DD.** Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:399-433. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.399>
17. **Dias S, Silva H Jr, Cumano A, Vieira P.** Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. *J Exp Med.* 2005;201:971-9. <https://doi.org/10.1084/jem.20042393>
18. **Milne CD, Paige CJ.** IL-7: A key regulator of B lymphopoiesis. *Semin Immunol.* 2006;18:20-30. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2005.10.003>
19. **Ueda Y, Yang K, Foster SJ, Kondo M, Kelsoe G.** Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *J Exp Med.* 2004;199:47-58. <https://doi.org/10.1084/jem.20031104>
20. **Ueda Y, Kondo M, Kelsoe G.** Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *J Exp Med.* 2005;201:1771-80. <https://doi.org/10.1084/jem.20041419>
21. **von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R.** Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med.* 1995;181:1519-26. <https://doi.org/10.1084/jem.181.4.1519>
22. **Morrison SJ, Wright DE, Weissman IL.** Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:1908-13
23. **Inra CN, Zhou BO, Acar M, Murphy MM, Richardson J, Zhao Z, *et al.*** A perisinusoidal niche for extramedullary haematopoiesis in the spleen. *Nature.* 2015;26:466-71. <https://doi.org/10.1038/nature15530>