



Factor estimulante de colonias de granulocitos y su efecto en el ámbito reproductivo

Álvaro Santibáñez Morales,* Fiorella Bagnarello,** Ana Paola Sánchez Serrano,* Julio Francisco de la Jara*

RESUMEN

Introducción: el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una citocina que estimula la diferenciación celular de las células germinales; se ha observado su producción en líquido folicular y parece desempeñar una función importante en el desarrollo folicular humano, el desarrollo y división celular embrionaria y la implantación.

Objetivo: hacer una revisión de la bibliografía médica para poder esclarecer el panorama y la probable función del G-CSF en los aspectos reproductivos de la embriología humana.

Material y métodos: en PubMed y MedlinePlus® se realizó una revisión de artículos pertinentes a ciencias básicas, relacionados con la embriología humana y que tuvieran en el título la frase *factor estimulante de colonias de granulocitos*.

Conclusiones: el G-CSF es una citocina que desempeña una función fundamental en los diferentes procesos de la reproducción humana. Aún se requiere realizar diversos estudios para esclarecer su función e importancia en dichos procesos.

Palabras clave: factor estimulante de colonias de granulocitos, desarrollo folicular humano, implantación, desarrollo y división celular embrionaria, reproducción humana.

ABSTRACT

Introduction: Granulocyte colony-stimulating factor is a cytokine that stimulates differentiation of hematopoietic stem cells. Recently it has been observed that it is produced in follicular fluid and plays an important role in human follicular maturation, embryo development, cleavage and implantation.

Objective: To make a review of literature to clarify the role and importance of G-CSF in human reproduction.

Material and methods: Using PubMed and MedlinePlus® we searched for published articles related to human embryology containing in the title the phrase *granulocyte colony-stimulating factor*.

Conclusions: G-CSF seems to be a promising factor involved in reproduction, further studies are needed to clarify its role and importance.

Key words: granulocyte colony-stimulating factor, human follicular development, implantation, embryonic development and cell division, human reproduction.

G-CSF Y HUMANOS

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una citocina que estimula la proliferación y diferenciación de las células

hematopoyéticas, principalmente hacia la línea neutrofilica.¹ Se encuentra codificado en el gen 17q11-22.²

La identificación de G-CSF fue posible gracias al cultivo de células progenitoras hematopoyéticas, que fueron desarrolladas a mediados del decenio de 1960 por Metcalf, Sachs y colaboradores.² Estos sistemas *in vitro* mostraron que la supervivencia, la proliferación y la diferenciación de las células hematopoyéticas inmaduras dependen de factores humorales, que se denominan “factor estimulante de colonias” (CSF).²

La capacidad de producción de G-CSF es una característica de una variedad de tipos de células después de una estimulación apropiada. Los monocitos/macrófagos se encuentran entre las principales fuentes de G-CSF, pero este factor también puede ser producido por células normales de origen mesodérmico, como las células endoteliales vasculares, los fibroblastos y las células

* Médico especialista en Ginecología y Obstetricia, Biólogo de la Reproducción, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

** Médico especialista en Ginecología y Obstetricia.

Correspondencia: Dr. Álvaro Santibáñez Morales. Correo electrónico: alvaro2304@hotmail.com

Recibido: septiembre, 2011. Aceptado: noviembre, 2011.

Este artículo debe citarse como: Santibáñez-Morales A, Bagnarello F, Sánchez-Serrano AP, De la Jara JF. Factor estimulante de colonias de granulocitos y su efecto en el ámbito reproductivo. Rev Mex Reprod 2012;4(4):147-152.

mesoteliales.² La producción de G-CSF puede ser inducida *in vitro* en estas células por una amplia variedad de agentes estimulantes, como LPS, TNF, IL-1, 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA), GM-CSF, IL-3, IL-4 e interferón γ .²

El G-CSF ejerce su efecto biológico a través de la unión a su receptor. Nicholas Metcalf demostró en neutrófilos maduros la existencia de receptores específicos, saturables y de alta afinidad de G-CSF. El receptor para el G-CSF es un heterodímero compuesto de una cadena α (el ligando específico) y de una cadena β común (β c). Las vías de transducción de señales que se activan después de esta unión ligando-receptor están en estudio; al parecer, hay dos vías de señalización y cada una compromete una región diferente de la cadena β c; una de ellas lleva a la inducción de C-myc y a la replicación del ADN. La segunda vía compromete la activación de proteínas de la familia Ras y proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas).²

Se han obtenido de manera sintética dos formas recombinantes: una glicosilada (lenograstim), que es sintetizada en células de mamíferos, y otra no glicosilada (filgrastim), sintetizada en *Escherichia coli*; esta última tiene la misma actividad biológica que la natural endógena.³

En humanos se utiliza de manera segura desde 1991; fue aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA)⁴ como auxiliar en el tratamiento de leucemia y en pacientes susceptibles de recibir quimioterapia por cualquier índole, como cáncer de mama y cáncer de colon.⁵ También se ha utilizado en pacientes con infarto agudo de miocardio (con resultados favorables y excepcionales si se utiliza en el episodio agudo),⁶ así como en pacientes con choque séptico,¹ virus de la inmunodeficiencia humana, pie diabético, fiebre neutropénica y estados de inmunodepresión.⁷

G-CSF Y REPRODUCCIÓN

En el ámbito reproductivo, Zhao y col. publicaron por primera vez en 1995 la existencia de G-CSF y su receptor en tejido ovárico, determinada por reacción en cadena de la polimerasa en 65 mujeres, que fueron sometidas a histerectomía o cistectomía.⁸ En ese mismo año Giacomini y col. detectaron en el endometrio

humano, por medio de inmunoelectrotransferencia, concentraciones de G-CSF de hasta 4,440 pg/mL, así como su síntesis.⁹

En 1999 Sjöblom y col. cultivaron sorpresivamente embriones donados a investigación, valoraron el efecto de G-CSF a 2 ng/mL en el medio de cultivo (desde el día 2 de desarrollo) y observaron una mejor progresión embrionaria, que estadísticamente fue significativa, tomando como escala de valoración la clasificación embrionaria de Lucinda Veeck. De manera interesante observaron una mejor capacidad de adherencia, así como capacidad de blastulación en las membranas sintéticas en el día 5 de desarrollo.¹⁰

En 2001 Kawano y col. reportaron la cuantificación de G-CSF, obtenido de aspirado de líquido folicular de pacientes en tratamiento de fertilización *in vitro* (FIV), y su correlación positiva con ovocitos maduros en estadio de metafase II.¹¹ Los ovocitos maduros contenían concentraciones mayores o iguales a 100 pg/mL.

En 2002 Sjöblom y col. realizaron un reporte en el que valoraron el mecanismo de acción de G-CSF en embriones donados y observaron que este factor de crecimiento es el responsable de favorecer en el embrión la división celular de los blastómeros, de inhibir la apoptosis celular y de disminuir el porcentaje de fragmentación.¹² Estas observaciones las llevaron a cabo al inhibir en los embriones el receptor de G-CSF, con lo que pudieron observar qué sucedía en el ámbito embrionario, al no existir el efecto de G-CSF. En estos embriones, en los que se bloqueó el receptor, no se dividieron los blastómeros y se observó un alto índice de apoptosis.

En 2004 Kawano y col. reportaron un estudio en el que utilizaron una línea celular inmortalizada de células de la granulosa, las cuales fueron estimuladas con factor de necrosis tumoral alfa e IL-1 alfa. Al inferir que la ovulación es un fenómeno inflamatorio y al estimularla con estos factores se podrían mejorar las condiciones, ya que se incrementaría localmente el reclutamiento de macrófagos. Observaron un incremento significativo de G-CSF al estimular con ambos factores dosis/tiempo dependiente.¹³

En ese mismo año Salmassi y col. decidieron cuantificar el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en líquido folicular y en suero el día de la aplicación de la gonadotropina coriónica humana en

pacientes en tratamiento de FIV, así como determinar la existencia del receptor de G-CSF en células de la granulosa. La mediana de G-CSF en líquido folicular fue de 117.98 pg/mL y fue mayor en líquido folicular que en suero, y como en estudios previos, lograron determinar dicho receptor en células de la granulosa.¹⁴

Un año después Salmassi y col. cuantificaron, en suero y líquido folicular, el G-CSF y el estradiol de pacientes sometidas a fertilización *in vitro*. En el grupo I dividieron el análisis de acuerdo con la respuesta ovular (baja, media y alta respondedora) de 82 pacientes. En el grupo II cuantificaron en suero el G-CSF de 23 pacientes en su ciclo menstrual. En el grupo III el día de la punción folicular cuantificaron en líquido folicular el G-CSF de 11 pacientes con endometriosis moderada a severa. De este estudio puede concluirse que la concentración en suero es menor que en líquido folicular. Durante la fase ovulatoria del ciclo menstrual el G-CSF en suero aumenta hasta valores máximos. También se observa que el G-CSF en suero se correlaciona con la respuesta ovular (baja, normal y alta respondedora). También se correlaciona con las tasas de embarazo. En las pacientes con endometriosis la concentración de G-CSF es menor que en las pacientes sin endometriosis; la concentración es casi igual en las bajas respondedoras. Se concluye que el G-CSF se correlaciona directamente con la tasa de embarazo y la capacidad de respuesta ovular a la estimulación.¹⁵

En noviembre de 2006 Papayannis y col. publicaron en Buenos Aires, en *Reproductive BioMedicine Online*, un estudio en el que se observa que el cultivo de embriones con G-CSF a 2 ng/mL puede favorecer a los medios de vitrificación y descongelación útil para lograr una mejor expansión celular en blastocistos.¹⁶

En 2008 Lédée y col. realizaron un estudio con la intención de encontrar un factor predictivo de calidad embrionaria en el líquido folicular de cada ovocito. En 132 pacientes cuantificaron 28 citocinas, incluido el G-CSF, y encontraron que por arriba de 20 pg/mL el G-CSF en líquido folicular se correlaciona con embriones de muy buena calidad, y fue el único en correlacionar con la calidad embrionaria y su capacidad de implantación.¹⁷

En ese mismo año Asimakopoulos y col. realizaron un estudio similar en 43 mujeres, en el que en el líquido folicular de cada ovocito cuantificaron ocho citocinas,

estradiol y progesterona (sin incluir G-CSF) y no encontraron correlación con la calidad embrionaria y el embarazo.¹⁸

En 2009 Scarpellini y col. publicaron un estudio clínico con distribución al azar, doble ciego, en el que administraron (en aplicación subcutánea) G-CSF (filgrastim), a dosis de 1 µg/kg/día, en 68 mujeres menores de 39 años con diagnóstico de pérdida gestacional recurrente. Iniciaron el día 6 posterior a la ovulación, y en los casos de embarazo continuaron durante nueve semanas. La tasa de nacimiento en el grupo tratado con G-CSF fue de 82.8% (29 de 35) y en el grupo placebo fue de 48.5% (16 de 33). También cuantificaron semanalmente, durante el primer trimestre, las concentraciones de gonadotropina coriónica humana en ambos grupos y un control sano y observaron un aumento significativo en el grupo tratado con G-CSF. No hubo mayor tasa de malformaciones ni de complicaciones durante el embarazo.¹⁹

En abril de 2010 Agerholm y col. publicaron en *Reproductive BioMedicine Online* un estudio multicéntrico, prospectivo, controlado con placebo y doble ciego, en el que examinaron el efecto en la constitución cromosómica al añadir en el cultivo embrionario G-CSF a dosis de 2 ng/mL. El estudio lo realizaron en 86 óvulos (donados por 73 mujeres) a los que se agregó el G-CSF en el medio de cultivo; desde la fertilización hasta el día 3 de crecimiento no encontraron diferencias estadísticamente significativas al analizar los cromosomas 13, 16, 18, 21, 22, X y Y por hibridación *in situ* fluorescente.²⁰

Otro artículo publicado al respecto es el que Salmassi y col.²¹ publicaron en el año 2010, en el que, con base en la concentración de G-CSF en suero, cuantificaron en 95 mujeres (agrupadas en bajas, moderadas y buenas respondedoras) su respuesta a la estimulación ovárica para FIV, y a su vez determinaron (a lo largo de las distintas etapas del ciclo de FIV) las concentraciones de G-CSF en pacientes embarazadas y no embarazadas. Las pacientes con buena respuesta a la estimulación recibieron menores dosis de hormona folículo-estimulante recombinante; además, se obtuvieron mayores concentraciones de estradiol, mayor número de ovocitos y una mayor tasa de embarazos (51.7%) en comparación con las de baja y moderada respuesta. La concentración de G-CSF fue mayor en las buenas respondedoras, lo que

implica que esta citocina se asocia con los procesos de foliculogénesis y ovulación.

En las pacientes embarazadas y no embarazadas se determinó la cantidad de G-CSF los días 3-5, 6-8 y 9-11, el día de aplicación de la gonadotropina coriónica humana (día de disparo), el día de captura ovular, el día de transferencia y en las semanas 1, 2, 3 y 4 postransferencia. El G-CSF aumentó gradualmente desde el inicio de la estimulación ovárica hasta el día de disparo y alcanzó un pico, en embarazadas y no embarazadas, el día de la captura folicular; sin embargo, en las pacientes que lograron embarazo hubo un aumento significativo desde el día de la transferencia, ya que alcanzaron un pico dos semanas después (día de confirmación del embarazo), y luego tuvieron un descenso gradual en las semanas 3 y 4 postransferencia en contraste con las que no se embarazaron, ya que éstas no tuvieron cambios en la concentración de G-CSF a partir del día de la transferencia.

Esta expresión característica de G-CSF en las pacientes embarazadas los días posteriores a la captura ovular, respecto a las no embarazadas, sugiere que el G-CSF desempeña una función importante en el proceso de implantación.

Ese mismo año (2010), en una carta al editor de *Human Reproduction*, Würfel y col. reportaron que realizaron un estudio piloto en pacientes con fallo en lograr implantación en cinco intentos de FIV previos y con ausencia de receptor KIR. La incidencia de esta ausencia de receptor fue asombrosamente alta, ya que fue de 78% en ese grupo de pacientes. Se realizó FIV-ICSI en esas pacientes y se aplicaron (a partir de la transferencia embrionaria) 13 millones de UI de G-CSF en días terciados (aparte del soporte acostumbrado en la fase lútea), con lo cual la tasa de embarazo bioquímico fue de 78% y la de embarazo clínico fue de 38%.²²

Con esta información concluimos nuestra revisión de la bibliografía médica: el G-CSF es indispensable para el proceso de maduración ovocitaria, para la fertilización embrionaria y para su posterior desarrollo. También desempeña una función fundamental en los procesos de implantación y de desarrollo inicial de la vida embrionaria *in utero*. Los mecanismos exactos se desconocen.

En el Cuadro 1 se resumen las publicaciones existentes sobre G-CSF y su relación con el ámbito reproductivo.

Cuadro 1. Resumen de las publicaciones sobre G-CSF y su relación con el ámbito reproductivo (Continúa en la siguiente página)

Año	Autor	Aportación	Conclusión
1995	Zhao	Uso de reacción en cadena de la polimerasa en el tejido ovárico para medir la existencia de G-CSF	Existe G-CSF en el tejido ovárico
1995	Giacomini	Determinación de G-CSF en el endometrio mediante inmunoelectrotransferencia	4,400 pg/mL, cuantificación normal de G-CSF en el tejido endometrial
1999	Sjöblom	Cultivo de embriones donados, en medio de cultivo con G-CSF (2 ng/mL)	Mejor blastulación y menor fragmentación embrionaria
2001	Kawano	Cuantificación de G-CSF en el líquido folicular y correlación con madurez ovocitaria	Mejores óvulos, arriba de 100 pg/mL
2002	Sjöblom	Embriones con ausencia de receptor de G-CSF	No blastulan y los que blastulan lo hacen con índices de fragmentación muy altos; no se inhibe apoptosis celular
2004	Kawano	Estimulación de células de la granulosa, con factor de necrosis tumoral alfa e IL-1 alfa	Las concentraciones de G-CSF aumentan de manera lineal, en tiempo y dosis
2004	Salmassi	Cuantificación de G-CSF, en líquido folicular y en suero, el día de la aplicación de la gonadotropina coriónica humana (día de disparo) en pacientes en ciclo de FIV, así como cuantificar la existencia del receptor de G-CSF en células de la granulosa	Cuantificación folicular de 117.98 pg/mL

Cuadro 1. Resumen de las publicaciones sobre G-CSF y su relación con el ámbito reproductivo (Continuación)

Año	Autor	Aportación	Conclusión
2005	Salmassi	Cuantificación de G-CSF en suero y líquido folicular durante un ciclo menstrual normal, así como ciclos de FIV estimulados y ciclos de FIV con endometriosis	El G-CSF aumenta de manera gradual durante el ciclo (hasta la ovulación) y tiene una relación inversa en relación con el grado de endometriosis
2007	Papayannis	Uso de medios adicionados, con 2 ng/mL de G-CSF, para desvitrificación de blastocistos	Mejora la expansión de los blastómeros
2008	Lédée	Cuantificación de 28 citocinas en líquido folicular, como predicción de embarazo	Sólo el G-CSF fue predictivo de que el ovocito podría terminar en un embrión que produjera un embarazo
2008	Asimakopoulos	Cuantificación de ocho citocinas en líquido folicular, como predicción de ovocitos de mejor calidad; no se incluyó G-CSF	Ninguna correlación con embarazo
2010	Agerholm	Estudio multicéntrico, prospectivo, controlado con placebo y doble ciego en el que se examinó el efecto en la constitución cromosómica al añadir en el cultivo embrionario G-CSF a dosis de 2 ng/mL	No aumenta la cromosomopatía en embriones cultivados con G-CSF
2010	Salmassi	Con base en la concentración de G-CSF en suero, cuantificación en 95 mujeres (agrupadas en bajas, moderadas y buenas respondedoras) de su respuesta a la estimulación ovárica para FIV	Las concentraciones de G-CSF se correlacionan con la respuesta ovárica y predicen la probabilidad de embarazo
2010	Salmassi	A lo largo de las distintas etapas del ciclo de FIV determinación de las concentraciones de G-CSF en pacientes embarazadas y no embarazadas	En las embarazadas las concentraciones de G-CSF aumentaron significativamente desde el día de la transferencia y alcanzaron un pico dos semanas después
2010	Würfel	Estudio piloto en pacientes con fallo en lograr implantación y con ausencia de receptor KIR. Se aplicaron 13 millones de UI de G-CSF como soporte de la fase lútea	Embarazo bioquímico de 78% y embarazo clínico de 38%

G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos; FIV: fertilización *in vitro*; UI: unidades internacionales.

CONCLUSIONES

A nuestro parecer, el G-CSF es una citocina que desempeña una parte en todo el proceso reproductivo, en el desarrollo adecuado del folículo, la ovulación, la madurez ovocitaria y el adecuado crecimiento y desarrollo embrionario. Su función más estudiada clínicamente ha sido la implantación y al parecer sus efectos benéficos son prometedores.

Es importante no tomar esto como una recomendación para iniciar su uso clínico en todas las pacientes; es poco probable que todas las pacientes tengan algún beneficio. Como se muestra en el artículo de Würfel y col.,²² sus resultados no fueron estadísticamente significativos sino

hasta que pudieron diferenciar a ese grupo de pacientes con ausencia de receptores KIR en endometrio de otros grupos con fallos repetidos.

Es sumamente importante desarrollar protocolos que nos permitan esclarecer la función e importancia de cada uno de los diferentes procesos de la reproducción humana, en los que esta citocina parece estar implicada.

REFERENCIAS

1. Gutierrez-Delgado F, Bensinger W. Safety of granulocyte colony-stimulating factor in normal donors. *Curr Opin Hematol* 2001;8(3):155-160.
2. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 1991;78:2791-2808.

3. Vanz AL, Renard G, Palma MS, Chies JM, et al. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. *Microb Cell Fact* 2008;7:13.
4. U.S. Food and Drug Administration. U.S. Department of Health & Human Services. Therapeutic Biological Products Approvals. Disponible en: <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/ucm080402.htm>
5. Ho VT, Mirza NQ, Junco Dd D, Okamura T, Przepiorka D. The effect of hematopoietic growth factors on the risk of graft-vs-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a meta-analysis. *Bone Marrow Transplant* 2003;32(8):771-775.
6. Abdel-Latif A, Bolli R, Zuba-Surma EK, Tleyjeh IM, et al. Granulocyte colony-stimulating factor therapy for cardiac repair after acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J* 2008;156:216-226.
7. Kuritzkes DR, Parenti D, Ward DJ, Rachlis A, et al. Filgrastim prevents severe neutropenia and reduces infective morbidity in patients with advanced HIV infection: results of a randomized, multicenter, controlled trial. G-CSF 930101 Study Group. *AIDS* 1998;12(1):65-74.
8. Zhao Y, Rong H, Chegini N. Expression and selective cellular localization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and GM-CSF α and β receptor messenger ribonucleic acid and protein in human ovarian tissue. *Biol Reprod* 1995;53:923-930.
9. Giacomini G, Tabibzadeh S, Satyaswaroop P, Bonsi L, et al. Epithelial cells are the major source of biologically active granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human endometrium. *Hum Reprod* 1995;10:3259-3263.
10. Sjöblom C, Wikland M, Robertson SA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development *in vitro*. *Hum Reprod* 1999;14:3069-3076.
11. Kawano Y, Kawasaki F, Nakamura S, Matsui N, et al. The production and clinical evaluation of macrophage colony-stimulating factor and macrophage chemoattractant protein-1 in human follicular fluids. *Am J Reprod Immunol* 2001;45(1):1-5.
12. Sjöblom C, Wikland M, Robertson SA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) acts independently of the beta common subunit of the GM-CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos. *Biol Reprod* 2002;67(6):1817-1823.
13. Kawano Y, Fukuda J, Itoh H, Takai N, et al. The effect of inflammatory cytokines on secretion of macrophage colony-stimulating factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human granulosa cells. *Am J Reprod Immunol* 2004;52(2):124-128.
14. Salmassi A, Schmutzler AG, Huang L, Hedderich J, et al. Detection of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells. *Fertil Steril* 2004;81:786-791.
15. Salmassi A, Schmutzler AG, Schaefer S, Koch K, et al. Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? *Hum Reprod* 2005;20(9):2434-2440.
16. Papayannis M, Eyheremendy V, Sanjurjo C, Blaquier J, Raffo FGE. Effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor on growth, resistance to freezing and thawing and re-expansion of murine blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2007;14(1):96-101.
17. Lédée N, Lombroso R, Lombardelli L, Selva J, et al. Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Hum Reprod* 2008;23:2001-2009.
18. Asimakopoulos B, Abu-Hassan D, Metzen E, Al-Hasani S, et al. The levels of steroid hormones and cytokines in individual follicles are not associated with the fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2008;90:60-64.
19. Scarpellini F, Sbracia M. Use of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of unexplained recurrent miscarriage: a randomised controlled trial. *Hum Reprod* 2009;24(11):2703-2708.
20. Agerholm I, Loft A, Hald F, Lemmen JG, et al. Culture of human oocytes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor has no effect on embryonic chromosomal constitution. *Reprod Biomed Online* 2010;20(4):477-484.
21. Salmassi A, Mettler L, Jonat W, Buck S, et al. Circulating level of macrophage colony-stimulating factor can be predictive for human *in vitro* fertilization outcome. *Fertil Steril* 2010;93(1):116-123.
22. Würfel W, Santjohanser C, Hirv K, Bühl M, et al. High pregnancy rates with administration of granulocyte colony-stimulating factor in ART-patients with repetitive implantation failure and lacking killer-cell immunoglobulin-like receptors. *Hum Reprod* 2010;25(8):2151-2152.