

Makalenin Orjinal Adı: Ovulation induction and epigenetic anomalies

Yazarlar/Enstitü: Patricia Fauque, M.D., Ph.D. /Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Hôpital de Dijon, Université de Bourgogne, Dijon, France

Dergi: Fertility and Sterility, Vol. 99, No:3, pp:616–23, 2013.

Kısa Özet: Ovulasyon indüksiyonun ve epigenetik kontrolün bu sistematik derlemesinde, çalışmalar genellikle fare modelleri üzerinde erken embriyoya kadar gametlere yapılan hormon tedavilerinin epigenetik olarak yeniden programlaması sırasında nasıl zararlı olabileceği üzerinde duruldu. Ayrıca, yardımcı üremede kullanılan hormon protokolleri aynı zamanda uterusun fizyolojik ortamında değiştirebilir, bu da endometrial epigenetik bozuklar için potansiyel bir bağlantı noktasıdır. Şu anda, İnsanlarla ilgili mevcut birkaç veri, bize bağımsız bir şekilde anne yaşının etkisinin, infertilite problemlerinin, tedavi protokollerinin ve genomik yazılım sürecindeki hormon dozlarının hakkında bilgi vermede yetersiz kalmaktadır.

Giriş: Amerika birleşik devleti ve Avrupa'daki tüm doğumların yaklaşık %1 ila %2'sini içeren kesimdeki milyonlarca çocuk, yardımcı üreme tekniklerinin (YÜT) fertilite problemleri yaşayan çiftlere uygulanması yoluyla doğdu(1). Bu teknikler genellikle güvenli olarak kabul edilse de, kanıtlar, bu yöntemlerin kullanılması ile morbid konjenital problemler ve perinatal sonuçta olumsuz bir risk artışı olduğu yönünde(2). Ayrıca, çelişkili durumlar mevcut olsa bile(3-7), birkaç rapor anormal genomik imprinting'in neden olduğu artmış hastalık riskinin [Beckwith-Wiedemann sendromu (BWS-OMIM # 130650) (8-12) ve Angelman sendromu (AS-OMIM # 105830) (11, 13, 14) gibi] altını çizmiştir.

Genomik imprinting memelilere spesifik bir fenomendir, imprinting marks acquired erkek ve dişilerde cinsiyete özgü gametlerin düzenleyici bölümlerinde (farklı olarak metilenmiş bölümler(DMR'ler) aynı zamanda kontrol bölgeleri olarak da adlandırılan bölgelerde(ICR'lar)) gelişimsel genlerin bir alt kümesi olarak bulunur, imprinted genler olarak gösterilirler(15). Doğrusu, bu genlerin embriyonik büyüme ve gelişme, plasental fonksiyonlarda(16), postnatal metabolik yollarda ve kaynakların kontrolü ile ilişkili davranışlarda kritik roller oynadığı tespit edilmiştir(17). Dahası, onkogenez bozulmuş epigenetik değişikliklerle de ilişkili olabilir(18). Bu genler genellikle kümeler halinde yer almaktadır, DNA metilasyonu ile çoğunlukla epigenetik olarak işaretlenmiştir. Metilasyon, Metil grubunun(-CH₃) Guanin-sitozin dinükleotidindeki sitozin bazının 5. karbonuna bağlanması ile olur(19), histon modifikasyonu ile(asetilasyon/deasetilasyon ve metilasyon) ve bazende antisense RNA'lar ile ilişkilidir(20,21). Genomik imprinting genellikle maternal veya paternal allellerden birini baskılamaya yönelik çalışır ve sadece bir allelin ifadesine izin verir. Bu güne kadar en yaygın çalışılmış şey DNA metilasyonudur. Şu anda, farelerde ve insanlarda 150 adet imprint gen tespit edilmiştir. (<http://igc.otago.ac.nz>; www.geneimprint.com; www.mousebook.org/catalog.php?catalog=imprinting).

Primer DMR'lerin (aynı zamanda germline DMR'lar olarak da adlandırılan) allele spesifik metilasyonu, gametogenez sırasında cinsiyete özgü şekilde germ hücrelerinde gerçekleşir ve döllenmeden embriyo gelişimi boyunca kalıtsal bir “memory(bellek)” şeklinde korunur. Nitekim, bu diferansiyel metilasyon allele özgü ifade için erken safalarda meydana gelen global DNA metilasyonundaki

genomewide değişikliklere rağmen preimplantasyon gelişimi sırasında korunur(17). Bu germline DMR'lar parental allel-spesifik gen ekspresyonu için cis pozisyonunda yer alır. Çünkü bunların fonksiyonel haploidi ve epigenetik determinizmi, imprint genlerin anormal ekspresyonu ile genetik bozukluklara(delesyon, duplikasyon, mutasyon veya uniparental dizomi) ve aynı zamanda epimutasyonlara(metilasyon anomalileri) neden olabilir. Gözlemler BWS hastalarının YÜT ile BWS olmayan hastalara göre yaklaşık dokuz kat daha fazla gebe kaldığını göstermektedir(10) ve YÜT gametogenesis ve/veya erken embriyogenez sırasında genomun epigenetik kontrolünü bozabileceği ihtimali, YÜT sonrası gözlemlenen bu defektin sistematik bir epimutasyon olduğunu kuvvetle düşündürmektedir. YÜT sonrası doğan tüm BWS ve AS çocuklar da bu epigenetik kusurun bulunması, ilgili DMR'nin maternal allel üzerindeki hipometilasyon olmasıda ayrıca dikkat çekicidir. Böylece, YÜT'nin doğasındaki zararlı etkiler; öncelikle oositlerin olgunlaşma sürecinde gerçekleşen, dışı epigenetik yeniden programlanması sırasında meydana gelebilir.

In vitro fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) içeren YÜT genellikle hormon stimülasyon protokolleri sonrası genomik ve erken embriyonik materyal manipülasyonun birkaç adımını kapsar. Intrauterin inseminasyon (IUI), genellikle ovulasyon indüksiyonu ile kombine edilen başka bir YÜT'dir, ayrıca bu yöntem sperm hazırlamayı da içerir.

Günümüzde, YÜT prosedürlerinden hangilerinin epigenetik anormallikler içerdikleri hala belirsizliğini korumaktadır. Bununla birlikte, olası epigenetik değişikliklere ilişkin önemli konulardan biri de ovulasyonun yapay indüksiyonudur. IVF ve ICSI teknikleri ve IUI (donör spermi olsun ya da olmasın) sonrasında gebe kalınan çocuklarda gözlenen epigenetik bozukluklar bu durumu destekliyor. Dahası, bazı çalışmalarda, BWS ve AS hastalarının annelerinde kullanılan tek YÜT prosedürünün overyan stimilasyon olduğu tespit edilmiştir(11, 22, 23). Hormonal epigenetik bozulma lehine olan başka bir tartışma da; her iki gametogenez de DNA metilasyonu işaretlerinin asenkronize bir şekilde yapılmış olmasıdır. DMR'de DNA metilasyonu edinimi spermatogenezin prenatal aşamalarında gerçekleşir ve postnatal dönemde tamamlanır oysa primordial follikülden antral folliküle kadar gelişen oositlerde, oogenez daha geç(puberteden sonra)başlar. Bu periyotta ekzojen hormonlar kullanılarak uygulanan ovaryen stimülasyon oosit maturasyonundaki imprint acquisition'ı bozabilir. Ayrıca, IVF veya ICSI tedavilerinde daha fazla ovule olmuş oosit üretmek için kullanılan over stimülasyon dozu spontan ovulasyon ve hatta IUI tedavileriyle karşılaştırıldığında daha yüksektir.

Bu zorlu oosit maturasyonu, maternal özgü ekspresyonun kaybına ve normal olarak nonovule bazı oositlerde imprint bozukluklarının gelişmesine neden olabilir. Buna ek olarak, dışılerdeki infertilite vakalarında (düşük over rezervli veya ileri yaş gebeliklerde) tipik olarak daha yüksek doz hormonlar kullanılır. İnsanlarda, over stimülasyon etkisi ile infertiliteye katkıda bulunan diğer faktörlerin genomik imprint üzerindeki etkisini ayırt etmek son derece zordur.

Böylece hormon tedavilerinin zararlı etkileri oositlerin olgunlaşma sürecinde epigenetik yeniden programlanmayı değiştirebilir. Bununla birlikte, bu derlemedeki gelişmeler, over indüksiyonunun uterusun fizyolojik ortamını değiştirmesinin yanı sıra embriyonun implantasyonu ve gelişiminde etkileyebilir. IVF döngülerinde, tek gebelikteki doğum ağırlığı, taze embriyo transferinde frozen-thawed döngüsünden daha düşüktür(4,24-27). Bu bulgu epigenetik süreçler tarafından gonadotropin-stimule multifolikül gelişimi ve seks steroid hormonlarının düzeylerinin, fizyolojik düzeyin üzerindeki seviyelerde üretiminin

embriyo implantasyon zamanında rol alabileceği fikrini doğurmuştur. Bunlar endometrial reseptiviteyi ve/veya trofoblastların invaziv özelliklerini düzenleyebilir. Ve ayrıca düşük doğum ağırlığı ve anormal plasantanın getirdiği diğer bozuklukların artmış riskini, epigenetik contributing faktörle ortaya koyarlar.

Fare ve İnsan Oositinde Epigenetik Yeniden Programlama

Farelerde epigenetik yeniden programlama yaklaşık olarak embriyonik gün 7.25(E7.25)de epiblast hücrelerinden germ hücre gelişimi ile başlar, Primordial germ hücrelerinin(PGC) genital ridge(sırta) ulaşması ile(E10.5) devam eder ve E13.5 son bulur(28)(insanda 42-44 günleri arasında). Gelişmekte olan gonadlar içine migrasyondan sonra, PGC'lerinde belirgin bir genomewide DNA demetilasyonu olur. Metilasyonun genom dizilimine bağlı olarak embriyonik kök hücrelerinde bu seviyeler %73.2 -%85 kadar yüksek iken, E13.5 olan dişi PGC'lerinde bu durum %10'dan azdır. Bu DNA demetilasyonu aynı zamanda baskılanmış lokuslarla ilgilidir(30,31). Tekrarlayan elemanların belirli bir alt kümesi olan, Inreacisternal A-particle(IAP) elemanları olarak tanımlanan elemanlar PGC'leri içindeki yeniden programlamaya dirençli kalır(31,32). Muhtemelen kısıtlı hücre sayılarından dolayı oosit kromatin durumu çalışmaları sınırlı kalmıştır. Bununla birlikte, kromatin değişimler histon varyant değişimi ve geniş bir erasure(silme) eşliğinde birçok histon modifikasyonu (baskın histon H3K9me3 ve H3K27me3 kaybı, hem de aktif histon işaretinin kaybı H3K9ac) bu periyotta meydana gelir(31). Çok geçici olan kromatin düzenlemelerinin aksine (E11.5 dan E12.5 kadar gibi kısa sürede)(31), yeni dizilere kadar, imprinted genlerin farklılaşmış DNA demetilasyonunun silinmesi cinsiyete özgü bir şekilde(erkek ve dişi germlinelerinde farklı zamanlarda ortaya çıkar) embriyoya daha sonra empoze edilir.

Fare modelinde bulunduğu gibi, neonatal faz süresince; primer follikülle antral follikül evreleri arasındaki oositin profaz I de durduğu spesifik zamanlarda dişi germline'daki imprint işaretlerinin kurulması gene özgü bir şekilde meydana gelir(33-35). Metilasyon antral folikül aşamasına kadar artarak devam eder ve antral folikül aşamasında tam olarak tamamlanmış olduğu tespit edilmiştir. Dnmt3L ile işbirliği içindeki de novo metilaz Dnmt3a; tekrarlayan serilerde yeni DNA metilasyon durumunun kurulmasından, gelişimsel genlerden (36, 37) ve cinsiyete özgü germline DMR imprintini (38, 39) resetlemekle sorumludur. Farenin neonatal oosit gelişiminin metilasyon imprint acquisition sırasında son olarak Pegl (imprinte olmuş bir gen) görülür (33, 40). Bununla birlikte, maternal imprint'in yetişkin fare folikülünün büyümesi sırasında, analiz edilmiş tüm imprint genlerle aynı zamanda sağlanmış olduğu ve metilasyon dinamiklerinin yeni doğan dönemi ile karşılaştırıldığında daha progresif olduğu görülmektedir(40).

Yetişkin insan oositogenezinde, maternal imprinting zamanlaması fare modeli ile aynı olduğu görülmektedir(40). Maternal olarak metile DMR'lar DNA metilasyonunun yaklaşık %50'sini erken folikül evrelerinde (primordial ve primer follikül aşamalarında) gerçekleştiriyor ve oositler geç antral folikül dönemine geldiğinde metillenme tamamen bitmiş oluyor(Fig 1). Paternal olarak metillenen DMR'lar tüm aşamalarda unmetile kalır.

Khoueiry ve ark.(41), mayoz II'nin ilerlemesi ile KCNQ10T1 DMR(KvDMR1)'nin yavaş yavaş de novo metilasyonuna uğradığını gözlemlemiştir. İndüklenen sikluslarda çoğu MII fazında olan tam anlamıyla olgunlaşmış germinal vezikül(GV)oosit allellerinin tamamına yakını DMR üzerinden Metillenmiştir(allellerinin yaklaşık üçte ikisi). Bununla birlikte, KvDMR1'in başka bir bölgeini analiz eden Genuns ve ark.(42), bu imprint olmuş gen içinde GV aşaması gibi erken bir dönemde bir uçtan diğer uca metile bir desen bildirdiler. İki grup arasındaki bu tutarsızlık, bu DMR'nın iki bölgesinin disasosiyasyon bir metilasyon acquisition ile açıklanabilir.

ICR'lardan çoğunun oosit içinde metillenmiş olması ilginç bir sonuçtur(20 tanımlanmış gDMRs/ICRs'dan 17 maternal ICR), buna karşın sadece üç sperm metilliydi(paternal gDMRs). Böylece, bu yüksek sayıdaki maternal ICR'lar, maternal epigenetik yeniden programlama sırasında imprint hataları sıklığının istatistiksel olarak spermden daha yüksek olduğunu gösteriyor. Buna ek olarak, maternal ICRs'ler CpG island promoters'leridir. Oysa paternal ICR'lar ise nispeten daha zayıf ve intergenik CpG. Daha önce de belirtildiği gibi, bu cinsel farklılıklar için evrimsel nedenler, dişi ve erkek gametogenezinin farklı gelişim kinetiğine bağlı olabilir(43,44). Dahası, araştırmacılar tarafından bildirilen sonuçlar maternal yeniden programlamanın öneminin altını çizmeye yöneliktir. Fetomaternal arayüzün kurulması ile ilgili biyolojik yolların düzenlenmesi konusunda maternal ICRs erken gelişim döneminde dominant bir role sahiptir(44).

OVULASYON İNDÜKLEMENİN EPİGENETİK ETKİLERİ

Preimplantasyon periyodu

Hayvan modeli: Hayvan modeli sistemi gariptir çünkü subfertilite bunlarda kafa karıştırıcı bir problem değildir. Bugüne kadar, imprint üzerindeki süperovulasyonun etkileri hayvan çalışmalarında çelişkili sonuçlar sağlamıştır(Tablo 1). Gerçekten de, bazı araştırma grupları tarafından süperovulasyonun genomik imprinting üzerine olumsuz etkileri bulunmuştur. Mann ve ark. İndüklenmiş ovule olan dişilerle, spontan ovulasyonu gerçekleştiren dişileri karşılaştırdığında blastokist aşamalarındaki embriyolarda Snrpn, Kcnqlot1 ve Peg3'te maternal metilasyon kaybı buldular. Bu imprinting hataları, yüksek hormon dozları sonrası(doza bağımlı bir şekilde) daha sık bozukluklar ortaya çıkardığı görüldü. Maternal metilasyon kaybına ek olarak, araştırmacılar blastokist aşamasında normal olarak unmetille maternal H19 alleli için maternal metilasyonu açısından bir kazanç gözlemiştir. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen; El hajj ve ark.(46) in vivo şartlarda üretilen süperovulasyonlu oositlerin, uyarılmamış döllenmeyle elde edilen 16 hücreli fare emriyolarına kıyasla imprinting hatalarının biraz daha yüksek seviyelerde olduğunu gözlemlemiştir. Ayrıca, Shi ve Haaf (47) metilsitozin immünofloresan yöntemini kullanarak süperovulasyonlu dişilerin süperovulasyonlanmamış dişilerle karşılaştırdığında embriyolarında anormal metilasyon paternlerini olduğunu bildirdi. Daha sonra, ilk çalışmalarında kullanılan superovulation koşullarının aynısının altında, Mann'ın takımı olgun oositlerde de normal imprint paternlerinin, aynı bölgelerinin metillenmiş olduğunu buldu(48). Snrpn, Peg3 ve Kcnqlot1 için metilasyon yüzdesinin % 100'e yakın olduğu ve H19 un metafaz II (MII)'deki olgun oositlerde beklendiği gibi metillenmemiş olduğunu bulunmuştur. Bu bulgularla uyumlu olarak, başka bir grup tarafından yapılan bir önceki çalışmada; süperovulasyonlu dişi farelerden hazırlanan olgun oositler havuzundaki, Igf2r'de olduğu gibi bu imprint genlerde (Snrpn, Peg3, ve H19) normal metilasyon paternleri sergilendiği bulunmuştur(49).

Bunun tersine, Sato ve arkadaşları (40) H19'un MII'deki süperovulasyonlu oositleri kullanarak oluşturduğu farelerin iki türünde (ICR ve BDF) metilasyon acquisition'u olduğunu gösterdi. Bununla birlikte, ortaya çıkan farklı sonuçlar; dişi farelerinin yaşlarının farklı olması, aynı zamanda uygulanan süperovulasyon prosedürlerinin diğer araştırma gruplarından tamamen farklı olmasıyla açıklanabilir. Doğrusunu söylemek gerekirse, oositler; 10 haftalık olan dişilere, 3 gün boyunca 7.5 IU pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) enjeksiyonuyla süperovulasyon sonrasındaki, 24. saatte 5.0 IU insan koryonik gonadotropin (hCG) enjeksiyonu ile toplandı. Ancak, önceki bir çalışmada süperovulasyon sonrası elde edilen olgun oositlerdeki maternal Peg1 / Mest imprint geni için heterojenik metilasyon bildirilmiştir(50). Süperovulasyonlu MII'deki oositlerde Peg1/Mest'in tamamen metillenmiş,

metillenmemiş ve karışık paternleri gözlemlendi. Bu gözlem bize bu süperovulasyondan sonra gendeki metilasyon imprintlerinin tam anlamıyla gerçekleşmediğini gösterdi(50). Yine başka bir çalışma; bu süperovulasyonun yalnızca H19 geninin DNA metilasyon durumunu etkilemediğini göstermiştir ancak bazı blastokistlerde ekspresyon seviyelerini etkilemektedir(51).

Son olarak, preimplantasyon döneminde yapılan hayvan çalışmalarının sonuçlarının çoğu, bize imprint acquisition'ının başlı başına süperovulasyondan etkilenmemiş olabileceğini göstermektedir bu da onun imprint maintance üzerindeki negatif rolüne işaret etmektedir. Süperovulasyon sonradan gelişen embriyolarda imprint maintance için gerekli olan maternal-etkili gen ürünlerinde (anormal maternal faktör sentezi ya da oositteki depolama) modifikasyonlar türetebilir(52). Biz, bu çeşitli oosit ve embriyo fenotiplerinin, hormon kaynaklı süperovulasyon sonrası gözlemlenen implantasyon ve fetal gelişim üzerinde verimlilik farkları içerebileceği hipotezini sunabiliriz(51). Buna ek olarak, Market-Velker ve ark. (53) bu süperovulasyonun embriyo kültürünün epigenetik aberran etkilerini artırabileceğini bildirmişlerdir (Muhtemelen genomik imprinting yeteneğini korumak için).

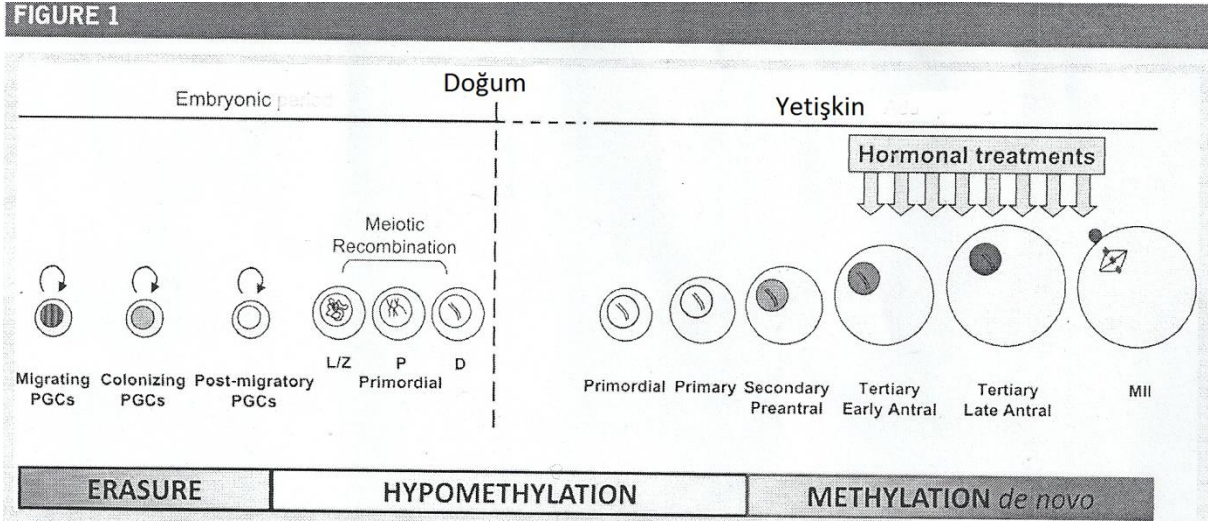


Fig 1: Folikül büyümesi sırasında metilasyon dinamiği. Epigenetik yeniden programlama gelişen gonadların içine doğru germ hücre gelişimi ile başlar. PGC'ler işaretli bir genomwide DNA metilasyonu sergiler. Bu metilasyonun erasure fazını gametlerin primordial fazda mayotik arresti(profaz I'in diploten evresinde) takip eder. Hormon tedavisi uygulandığı dönemde(postnatal primer folikülden antral folikül evresine kadar) Maternal metilasyon imprintleri sağlanır. D=Diploten, L=Leptoten, MII=metafaz II, P=Pakiten, Z=Zigoten(Bourc'his and Proudhon'dan adepte edilmiştir)(77).

İnsan Modeli: Fare modelinde olduğu gibi, Sato ve arkadaşları (40) infertilite tedavilerindeki ovaryen uyarılma sonrası elde edilen ve ayrı ayrı olarak bisülfid mutasyon sekanslamasıyla elde edilen PEG1 (metilasyon kaybı) ve H19 (metilasyon acquisition) genleri için imprint hataları bulmuştur(Tablo 2). Bununla birlikte, onlar DNA metilasyonundaki bu defektlerin süperovulasyon protokolüyle, hastanın yaşıyla, gecikmeli oosit maturasyonu ile mi, yoksa bu durumun dışı infertilitesinin doğasıyla mı alakalı bir durum olup olmadığını ayırt edememişlerdir. Khoeiry ve ark. (41) GV'de ve doğal siklus metafaz I(MI)'indeki oositlerde, bu uyarılmış siklusa göre KCNQ1OT1 DMR (KvDMR1)in daha fazla metillenmiş olduğunu izlemiştir(Sırasıyla GV için % 67.8'e % 62.5 / MI için %70.3'e %63.6). Bu bize bu gonadotropin stimülasyonun oosit maturasyonu ve/veya muhtemelen çok genç folliküllerin

toplanımı sırasında de novo metilasyon dinamiklerinin deđiřtirelebileceđini dűřündürmektedir.

Bu sonuçlar, over kaynaklı uyarılmıř hűcrelerden elde edilen matűr oositlerin yarısında spontan olarak KCNQ1OT1 için anormal derecede dűřűk bulunan metilasyon paternlerini řeklinde analiz etmiř(MII deki 4 oositten 2'si) Geuns ve arkadařları(42)'nın daha űnceki yayınlanları ile tutarlıdır. Bu imprint hataları; oositlerdeki geliřimsel gecikmeden dolayı dođru zamanda imprint kurulmasını(establishments) engellemesiyle ya da over stiműlasyonu ya da oositlerdeki imprint acquisition'a yapılan in vitro kűltűr műdahaleleri nedenleriyle olabilir. Bununla birlikte, aynı arařtırma grubu daha űnce spontan olarak in vitro řartlarda űretilen 3 matűr oositte bařka bir maternal imprinted geni (SNRPN geni) için normal metilasyon profillerini gűstermiřtir(54).

TABLE 1

Epigenetic effects after ovarian induction in the mouse model.

Study	Superovulation	Method	Samples	Gene	Results
Sato et al., 2007 (40)	3 imes 7.5 IU PMSG, 5 IU hCG	Combined bisulfite PCR restriction analysis	Pool of 30–50 MII oocytes	<i>Peg1, Lit1, Zac, H19</i>	Gain of methylation.
Fauque et al., 2007 (51)	5 IU PMSG, 5 IU hCG	Bisulfite mutagenesis sequencing RT-qPCR (TaqMan technology)	20 individual blastocysts	<i>H19</i>	Normal methylation profiles. Altered expression levels.
Fortier et al., 2008 (58)	5 IU PMSG, 5 IU hCG	Bisulfite mutagenesis sequencing RT-PCR	36 individual embryos and placentae (9.5 dpc)	<i>Snrpn, H19, Igf2, Kcnq1ot1</i>	Normal methylation profiles. Loss of imprinted expression for <i>Snrpn, H19, Igf2, Kcnq1ot1</i> in principally placentae.
Anckaert et al., 2009 (49)	5 IU PMSG, 5 IU hCG	Bisulfite mutagenesis sequencing	3 pools of 100–150 MII oocytes	<i>Snrpn, H19, Igf2, Peg3</i>	Normal methylation profiles.
Market-Velker et al., 2010 (53)	6 or 10 IU PMSG, 10 IU hCG	Bisulfite mutagenesis sequencing	10 individual blastocysts	<i>Snrpn, H19, Peg3, Kcnq1ot1</i>	Loss of methylation for <i>Snrpn, Peg3, Kcnq1ot1, H19mat</i> and gain of methylation for <i>H19pat</i> .
El Hajj et al., 2011 (46)	7.5 IU PMSG, 7.5 IU hCG	Bisulfite mutagenesis sequencing	10 individual 16-cell embryos	<i>Snrpn, H19</i>	Loss of methylation for <i>Snrpn, H19pat</i> , and gain of methylation for <i>H19mat</i> . Abnormal methylation patterns observed also in embryos produced without superovulation.
Denomme et al., 2011 (48)	6.25 or 10 IU PMSG, 10 IU hCG	Bisulfite mutagenesis sequencing	125 individual MII oocytes	<i>Snrpn, H19, Peg3, Kcnq1ot1</i>	Normal methylation profiles with 6.25 IU PMSG.
de Waal et al., 2012 (69)	5 PMSG, 5 IU hCG	Bisulfite mutagenesis sequencing RT-PCR Bisulfite mutagenesis sequencing	4 individual male and 4 individual female juvenile offspring: brain and liver tissue Spermatogonia from superovulation-derived mice	<i>Snrpn, H19, Peg3, H19</i>	Loss of methylation for <i>H19</i> in 1/8 juvenile offspring. Loss of methylation for <i>Peg3</i> in 2/8 juvenile offspring. Altered expression levels for <i>H19, Snrpn, and Peg3</i> . Delayed remethylation of maternal DMR <i>H19</i> (8% to 25% methylation) as compared with those from the naturally conceived male pups (46% to 49%).

Tablo 1: dpc: post coitus sonrası geen sűre, DMR=farklı řekilde metillenmiř alan, PMSG=pregnant mare serum gonadotropin, RT-qPCR=real-time kantitatif PCR

TABLE 2

Epigenetic effects after ovarian induction in humans.

Study	Superovulation	Method	Samples	Gene	Results
Geuns et al., 2003 (54)	HT	Bisulfite mutagenesis sequencing	7 individual GV, 3 individual MI and MII oocytes	<i>SNRPN</i>	Normal methylation profiles
Geuns et al., 2007 (42)	HT	Bisulfite mutagenesis sequencing	6 individual GV and MI and 4 individual MII oocytes	<i>KCNQ1OT1</i>	Normal methylation profiles in 15 of 16 oocytes
Sato et al., 2007 (40)	HT	Bisulfite mutagenesis sequencing	10 individual MI oocytes	<i>PEG1, H19</i>	Gain of methylation for <i>H19</i> and loss of methylation for <i>PEG1</i>
Khoueiry et al., 2008 (41)	HT	Bisulfite mutagenesis sequencing	11 pools of 1–3 MII oocytes	<i>KCNQ1OT1</i>	Loss of methylation

Tablo 2: GV: germianl vezikül, HT=hormon tedavisi, MI=Metafaz I, MII=Metafaz II

İmplantasyon ve İmplantasyon Sonrası Periyotlar

Süperovulasyonlu farelerden elde edilen kanıtlar, fetal büyüme geriliğinin ve hormon tedavisi ile artan sayıdaki rezorpsiyonların yüksek bir riski olduğunu göstermiştir (55-57). Bu İmplantasyon sürecinde 3 önemli aktör etkilenebilir: Embriyonik hücreler, plasenta dokusu ve endometriyum.

Blastokist aşamasında bulunan Süperovulasyon sonrasındaki epigenetik bozulmalar, daha sonraki fare embriyo gebeliklerinde gözlenmemiştir(56). Ancak, maternal ve paternal kaynaklı imprinted genlerin (*Snrpn* ve *H19* genler) anormal biallelik ekspresyonu gestasyonun aynı döneminde fare plasentasında gözlemlendi. Bu imprinting defektleri ayrıca plasenta dokusundaki *Igf2* geninin artmış ekspresyonu ile ilişkili bulunmuştur. Bu sonuçlar göstermiştir; tek başına süperovülasyon; özellikle trophoectoderm'den türetilmiş dokularda, implantasyon süreci boyunca, imprint maintenance'si tehlikeye atabilir. Fare modelinde gözlenen bu imprinting girişimlerinin, insandaki yardımcı üremenin klinik sonuçlarının(Embriyo implantasyon yetersizliği, spontan abortus veya disfonksiyonel plasenta kaynaklı fetal büyüme geriliği) kolaylıkla tahmin edilebileceğini gösterdi.

Düşük implantasyon oranının başka bir olası nedeni indüklenen hücrelerdeki endometrial reseptiviteyi düşürülebilir. İnsanlarda bu hormon tedavilerinin endometrium matürasyonunu modifiye ettiği iyi bilinmektedir (58,59). Overlerin uyarılması, doğal döngülerinden ortalama olarak 1 ila 2 gün daha önce endometrial reseptivitenin penceresinde bir kayma ile endometrial gelişimin ilerlemesine yol açar(59). İndüklenen siklulardaki endometriyum, foliküler faz boyunca fizyolojik düzeyin üzerindeki steroid hormon düzeylerine maruz kalmaktadır; bu erken luteal fazdaki değişmiş bir steroid reseptör ekspresyonu profili için bazı durumlarda sorumlu tutulabilir(60).Ovaryen stimülasyon aynı zamanda derin sıralama(sequencing) yaklaşımlarında da gösterildiği gibi, endometrial kemokinler ve büyüme faktörleri dahil olmak üzere, endometrial reseptivitenin karmaşık mekanizmalarını içeren birçok genin ifade profilini değiştirebilir edebilir(61).

DNA Metilasyonu, fonksiyonel endometrium değişikliklerin mens döngüsü boyunca gözlemlenmesiyle kanıtladığı gibi, ovulasyon indüksiyonu ile ilişkili endometrial değişikliklerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabilir. Doğrusu, DNA metilasyonu desidualizasyon da olduğu gibi endometrial reseptiviteyi de içine alacak şekilde açıkça gösterilmiştir (62, 63). Son zamanlarda yapılan iki çalışmada üç DNA metytransferase'nin (*Dnmt1, 3a, 3b*) farklı ifade şekilleri bildirilmiştir. Bu, üreme döngüsünün dönemleriyle bağlantılıdır(64, 65). İnsan endometriumunun sekretuar fazında DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b mRNA seviyeleri proliferatif faz ile karşılaştırıldığında düşüktür. Dnmts döngüsü

sırasındaki bu mRNA ekspresyonu profilleri ayrıca fare modelinde de gözlenmiştir(66). Bir çalışmada, DNA demethylating ajan(thenucleoside analog 5-aza-2'-deoxycytidine) ile tedavi edilen farelerde; endometrial değişiklikleri kontrol eden genlerin ve endometrial Dnmts ekspresyonunun değişimiyle ilişkili olarak implantasyon bölgelerinin sayısında doza bağlı olarak bir düşüş gözlenmiştir(67).

Tüm bu bulgular; hormon tedavileri sonrasında embriyo implantasyonu sırasındaki endometriyal değişiklikler, DNA metilasyonunun potansiyel rolü için bir destek sağlar. Over stimülasyonun, Endometriyal DNA metilasyonu değişiklikleri ve implantasyon başarısızlığı süreçlerine etkisini açıklığa kavuşturmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Mesela, embriyonik veya endometriumun epigenetik bozukluklarının implantasyon başarısızlığındaki rolleri belirsizliğini korumaktadır. Yin ve arkadaşları(68) erken gebelik dönemindeki kayıpları modeli ile bu soruna değinmeye çalışmıştır. Araştırmacılar embriyodaki(uterustaki değil) metilasyon maintance'sındaki bu kusurları gözlemlemiştir, bu anormal embriyo implantasyonunun ve geliştirmesinin kökeni olabilir.

Kuşaklar üzerindeki etkiler

de Wall ve arkadaşları(69) tarafından farelerde yapılan bir çalışmada gonadotropin stimülasyonu kullanılan YÜT yönteminden bağımsız(ör. ICSI) bir şekilde epimutasyonlara neden olabildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, gonadotropin stimülasyonu kullanımı, süperovulasyon kökenli dişi ve erkek somatik dokularında DNA metilasyon kesintilerine ve/veya anormal allel-spesifik H19, Snrpn, ya da Peg3 ekspresyonuna sebep olduğu gösterilmiştir(sekiz farenin altısında). Araştırmacılar süperovulasyonun YÜT prosedürleri sırasında epimutations indüksiyonuna katkıda bulunabileceği sonucuna varılmıştır. Genel olarak, reprogramming erasure(yeniden programlanmadaki silinmelerden dolayı) epigenetik hatalar sonraki nesile aktarılamaz(70). Bu sonuçlar, de Waal ve arkadaşları tarafından ICSI fare modelleri sonrası(71) ve süperovulasyon tedavisi(69) sonrasında yakın zamanda gösterilmiştir. ICSI veya süperovulasyon tarafından indüklenen epimutasyonlar yetişkin erkeklerin erkek germline'larında düzeltildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, H19 geni için süperovulasyon ve ICSI'nin her ikisinde de spermatogenetik hücrelerin yeniden programlama sürecinde gecikme gözlenmiştir. Muhtemelen maternal DMR remetilasyonundaki gecikmeye bağlı olarak gözlenmiştir[süperovulasyon ürünü yavru farelerin %100'ünde (yedi farenin yedisinde)] (69).

Daha öncesinde Stouder ve ark.(72) süperovulasyonun kuşaklararası etkilerinin olabileceğini bildirmişti. Paternal ve maternal imprinted genlerin değişmiş metilasyon paternleri, süperovulasyon sonucu olan yavru farelerin spermalarında gözlemlenmiştir. Aynı zamanda, bazı durumlarda epigenetik kusuruların kuşaklar arasında geçiş gösterebileceği öne sürülmüştür. Gebe dişi farelerin endokrin fonksiyonları bozan fungisidlerle maruziyeti, en az üç kuşak devam eden erkek germline'ında değişmiş DNA metilasyon profillerine neden olmaktadır(73). Biz süperovulasyon sonrası ortaya çıkan kuşaklararası devam edebilen bu etkileri göz ardı edemeyiz.

İnsan yavruları için hormon tedavisinin epigenetik etkisi hakkında eldeki veriler sınırlıdır. Son zamanlarda, bir doğum cohort çalışmasında, Rancourt ve ark.(7) metilasyon seviyeleri GRB10, MEST, H19, SNRPN, ve KCNQ1 yanısıra 1GF2 DMR0'larının imprint kontrol bölgeleri(ICR) boyunca, ovulasyon indüksiyonu tarafından yalnızca plasenta ve kordon kanında kesintiye uğramadığını gösterdiler. Bununla birlikte, Bu güven verici bulgular, genomik yazılım üzerindeki etkisinin değerlendirilmesine izin vermez.

Sonuç:

Yardımlı üreme tedavilerinde, YÜT ile doğan infantlarda epimutasyonların olup olmadığını belirlemek zordur, Yardımlı üreme tedavilerinde, epimutasyonların bulunduğu YÜT infantlarda, epimutasyonun YÜT prosedürleri sonucumu yoksa infertilitenin kendisinin bir sonucu mu olduğunu belirlemek zordur. Buna ek olarak, şu anda epigenetik değişikliklerin YÜT'ün hangi safasında veya safalarında ortaya çıkabildiğinde belirsizdir. Bununla birlikte, birçok faktör overian indüksiyonun epimutasyon insidansındaki artışa katkıda bulunabildiği yönünde. İlk olarak, maternal imprinting acquisition (imprinting kontrol bölgelerinin(ICR) en fazla bulunduğu) nispeten daha uzun bir sürede gerçekleşir ve böylece potansiyel olarak daha fazla etkilenebilir maruz kalırlar. İkinci olarak, transfer için uygun embriyo sayısını arttırmak için kullanılan eksojen gonadotropinler normalde yıkıma gidecek olan çevredeki oositleri de büyümeye zorlayabilir. Son olarak, hormon terapileri, bazı durumlarda hızlandırılmış foliküler gelişimi uyarak oosit olgunlaşmasının kinetiğini değiştirebilir(74). Önceden de belirtildiği gibi, öyle görünüyorki oosit metilasyon edinimi her şeyden önce uygun oosit büyümesi gerektiren karmaşık bir olgudur. İnsan oositleri epigenetik hatalara daha eğilimli olabilir ve/veya daha fazla stresle karşılaşabilir(çoklu hormon uygulaması, ileri anne yaşı, çevresel faktörler veya doğal(inherent?) infertilite(75)). Infertilite etkileri hariç, hayvan çalışmaları, bu kritik dönemde kendi kendine olan ovulasyon indüksiyonunun olumsuz etkisinin altını çizmiştir.

YÜT sırasında gonadotropinlerin kullanımı, bazı MII oositlerin(inkomplet ya da labil imprintli) salınımına sebep olabilir. Buna ek olarak, insanlar ve farelerdeki çeşitli çalışmalar eksojen gonadotropinlerin oosit içinde olumsuz bir etki ile sonraki embryogenezis sırasında genomik imprint molekülerde değişiklikleri indükleyebileceği ortaya koyulmuştur. Mann grubu tarafından önerilen, oosit ile karşılaştırıldığında blastokist aşamasındaki embriyolarda epigenetik pertubasyonların frekansı göz önüne alınacak olursa, over stimülasyonu imprint acquisition'dansa imprint maintance'si için gerekli maternal faktörler üstünde daha büyük bir olumsuz etkiye sebep olabilir(76). Böylece hormon tedavileri gamet epigenetiğinin yeniden programlanma sürecinde early embriyolarda olduğu gibi zararlı olabilir. Bununla birlikte, bu başlıkta noncoding RNA veya histon modifikasyonları gibi diğer epigenetik faktörler tamamen keşfedilmemiş kalır.

Zararlı etkileri de uterusun fizyolojik ortamını değiştirebilir. Bu gözlem sonucu, süperovule dişilerden epimutasyonlu yavrular doğabilir ve bu defekt kuşaklar arası olabilir, sonuç olarak bu durum hormon tedavilerinin uzun ömürlü zararlı etkilere yol açabileceği endişesini arttırdı. Bu endişe, YÜT sonrasında doğan çocukların sağlığı konusunda daha fazla çalışmaya olan ihtiyacı güçlü bir şekilde destekler.

Son olarak insanlarla ilgili olan birkaç veri, dişi yaşının genetik imprinting üzerindeki etkisini belirlemede, infertilite problemlerinde ya da tedavi protokolleri ve hormon dozlarını belirlemeye yeteri kadar izin vermemektedir. Bu yüzden insanlar üzerinde daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Çünkü süperovulasyonun imprinting maintance üzerinde zararlı etkilere sahip olabilir, İnsanlardaki araştırmalarında sadece oositlerde değil, aynı zamanda embriyolar üzerinde de yapılması gerekmektedir. Over indüklemeye protokollerinin, genomun epigenetik kontrolü üzerindeki etkisi hakkında daha iyi bilgi sahibi olunması, YÜT uygulayıcıları arasındaki risk değerlendirme yeteneğini artırır.

REFERENCES

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology

(ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril* 2009;92:1520–4.

2. Ceelen M, van Weissenbruch MM, Vermeiden JP, van Leeuwen FE, Delemarre- van de Waal HA. Growth and development of children born after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2008;90:1662–73.
3. Bowdin S, Allen C, Kirby G, Brueton L, Afnan M, Barratt C, et al. A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders. *Hum Reprod* 2007;22:3237–40.
4. Kallen B, Finnstrom O, Nygren KG, Olausson PO. In vitro fertilization (IVF) in Sweden: infant outcome after different IVF fertilization methods. *Fertil Steril* 2005;84:611–7.
5. Manning M, Lissens W, Bonduelle M, Camus M, De Rijcke M, Liebaers I, et al. Study of DNA-methylation patterns at chromosome 15q11-q13 in children born after ICSI reveals no imprinting defects. *Mol Hum Reprod* 2000;6: 1049–53.
6. Tierling S, Souren NY, Gries J, Loporto C, Groth M, Lutsik P, et al. Assisted reproductive technologies do not enhance the variability of DNA methylation imprints in human. *J Med Genet* 2010;47:371–6.
7. Rancourt RC, Harris HR, Michels KB. Methylation levels at imprinting control regions are not altered with ovulation induction or in vitro fertilization in a birth cohort. *Hum Reprod* 2012;27:2208–16.
8. DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 2003;72:156–60.
9. Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, Siffroi JP, Flahault A, Le Bouc Y. In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN1OT gene. *Am J Hum Genet* 2003;72:1338–41.
10. Halliday J, Oke K, Breheny S, Algar E, Amor DJ. Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study. *Am J Hum Genet* 2004;75:526–8.
11. Ludwig H. Archives of Gynecology and Obstetrics: 135 years. *Arch Gynecol Obstet* 2005;271:1–5.
12. Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR, et al. Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J Med Genet* 2003;40:62–4.
13. Cox GF, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, et al. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002;71:162–4.
14. Orstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB, Spetalen S, Kierulf K, Skjeldal O, et al. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet* 2003;72:218–9.

15. Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001;2:21–32.
16. Coan PM, Burton GJ, Ferguson-Smith AC. Imprinted genes in the placenta— a review. *Placenta* 2005;26(Suppl A):S10–20.
17. Constancia M, Kelsey G, Reik W. Resourceful imprinting. *Nature* 2004;432: 53–7.
18. Paulsen M, Ferguson-Smith AC. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol* 2001;195:97–110.
19. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003; 33(Suppl):245–54.
20. Holmes R, Soloway PD. Regulation of imprinted DNA methylation. *Cytogenet Genome Res* 2006;113:122–9.
21. Lewis A, Reik W. How imprinting centres work. *Cytogenet Genome Res* 2006;113:81–9.
22. Sutcliffe AG, Peters CJ, Bowdin S, Temple K, Reardon W, Wilson L, et al. Assisted reproductive therapies and imprinting disorders—a preliminary British survey. *Hum Reprod* 2006;21:1009–11.
23. Chang AS, Moley KH, Wangler M, Feinberg AP, DebaunMR. Association between Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproductive technology: a case series of 19 patients. *Fertil Steril* 2005;83:349–54.
24. Belva F, Henriët S, Van den Abbeel E, Camus M, Devroey P, Van der Elst J, et al. Neonatal outcome of 937 children born after transfer of cryopreserved embryos obtained by ICSI and IVF and comparison with outcome data of fresh ICSI and IVF cycles. *Hum Reprod* 2008;23:2227–38.
25. Pelkonen S, Koivunen R, Gissler M, Nuojua-Huttunen S, Suikkari AM, Hyden Granskog C, et al. Perinatal outcome of children born after frozen and fresh embryo transfer: the Finnish cohort study 1995–2006. *Hum Reprod* 2010;25:914–23.
26. Pinborg A, Loft A, Aaris Henningsen AK, Rasmussen S, Andersen AN. Infant outcome of 957 singletons born after frozen embryo replacement: the Danish National Cohort Study 1995–2006. *Fertil Steril* 2010;94:1320–7.
27. Shih W, Rushford DD, Bourne H, Garrett C, McBain JC, Healy DL, et al. Factors affecting low birthweight after assisted reproduction technology: difference between transfer of fresh and cryopreserved embryos suggests an adverse effect of oocyte collection. *Hum Reprod* 2008;23:1644–53.
28. Seki Y, Hayashi K, Itoh K, Mizugaki M, SaitouM, Matsui Y. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev Biol* 2005;278:440–58.
29. Popp C, Dean W, Feng S, Cokus SJ, Andrews S, Pellegrini M, et al. Genomewide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 2010;463:1101–5.

30. Lee J, Inoue K, Ono R, Ogonuki N, Kohda T, Kaneko-Ishino T, et al. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development* 2002;129:1807–17.
31. Hajkova P, Ancelin K, Waldmann T, Lacoste N, Lange UC, Cesari F, et al. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the Mouse germ line. *Nature* 2008;452:877–81.
32. Lane N, Dean W, Erhardt S, Hajkova P, Surani A, Walter J, et al. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis* 2003;35:88–93.
33. Lucifero D, Mann MR, Bartolomei MS, Trasler JM. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet* 2004;13:839–49.
34. Obata Y, Kaneko-Ishino T, Koide T, Takai Y, Ueda T, Domeki I, et al. Disruption of primary imprinting during oocyte growth leads to the modified expression of imprinted genes during embryogenesis. *Development* 1998;125:1553–60.
35. Obata Y, Kono T. Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. *J Biol Chem* 2002;277:5285–9.
36. Oda M, Yamagiwa A, Yamamoto S, Nakayama T, Tsumura A, Sasaki H, et al. DNA methylation regulates long-range gene silencing of an X-linked homeobox gene cluster in a lineage-specific manner. *Genes Dev* 2006;20: 3382–94.
37. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999;99:247–57.
38. Kaneda M, Hirasawa R, Chiba H, Okano M, Li E, Sasaki H. Genetic evidence for Dnmt3a-dependent imprinting during oocyte growth obtained by conditional knockout with Zp3-Cre and complete exclusion of Dnmt3b by chimera formation. *Genes Cells*. Published online February 1, 2010.
39. Shovlin TC, Bourc'his D, La Salle S, O'Doherty A, Trasler JM, Bestor TH, et al. Sex-specific promoters regulate Dnmt3L expression in mouse germ cells. *Hum Reprod* 2007;22:457–67.
40. Sato C, Shimada M, Mori T, Kumasako Y, Otsu E, Watanabe H, et al. Assessment of human oocyte developmental competence by cumulus cell morphology and circulating hormone profile. *Reprod Biomed Online* 2007;14: 49–56.
41. Khoueiry R, Ibala-Rhomdane S, Mery L, Blachere T, Guerin JF, Lornage J, et al. Dynamic CpG methylation of the KCNQ1OT1 gene during maturation of human oocytes. *J Med Genet* 2008;45:583–8.
42. Geuns E, Hilven P, Van Steirteghem A, Liebaers I, De Rycke M. Methylation analysis of KvDMR1 in human oocytes. *J Med Genet* 2007;44:144–7.
43. Bourc'his D, Bestor TH. Origins of extreme sexual dimorphism in genomic imprinting. *Cytogenet Genome Res* 2006;113:36–40.

44. Schulz R, Proudhon C, Bestor TH, Woodfine K, Lin CS, Lin SP, et al. The parental non-equivalence of imprinting control regions during mammalian development and evolution. *PLoS Genet* 2010;6:e1001214.
45. Market-Velker BA, Zhang L, Magri LS, Bonvissuto AC, Mann MR. Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum Mol Genet* 2010;19:36–51.
46. El Hajj N, Trapphoff T, Linke M, May A, Hansmann T, Kuhtz J, et al. Limiting dilution bisulfite (pyro)sequencing reveals parent-specific methylation patterns in single early mouse embryos and bovine oocytes. *Epigenetics* 2011;6:1176–88.
47. Shi W, Haaf T. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev* 2002;63:329–34.
48. Denomme MM, Zhang L, Mann MR. Embryonic imprinting perturbations do not originate from superovulation-induced defects in DNA methylation acquisition. *Fertil Steril* 2011;96:734–8.e2.
49. Anckaert E, Adriaenssens T, Romero S, Dremier S, Smits J. Unaltered imprinting establishment of key imprinted genes in mouse oocytes after in vitro follicle culture under variable follicle-stimulating hormone exposure. *Int J Dev Biol* 2009;53:541–8.
50. Imamura T, Kerjean A, Heams T, Kupiec JJ, Thenevin C, Paldi A. Dynamic CpG and non-CpG methylation of the *Peg1/Mest* gene in the mouse oocyte and preimplantation embryo. *J Biol Chem* 2005;280:20171–5.
51. Fauque P, Jouannet P, Lesaffre C, Ripoche MA, Dandolo L, Vaiman D, et al. Assisted reproductive technology affects developmental kinetics, H19 imprinting control region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos. *BMC Dev Biol* 2007;7:116.
52. Linke M, May A, Reifenberg K, Haaf T, Zechner U. The impact of ovarian stimulation on the expression of candidate reprogramming genes in Mouse preimplantation embryos. *Cytogenet Genome Res*. Published online November 15, 2012.
53. Market-Velker BA, Fernandes AD, Mann MR. Side-by-side comparison of five commercial media systems in a mouse model: suboptimal in vitro culture interferes with imprint maintenance. *Biol Reprod* 2010;83:938–50.
54. Geuns E, De Rycke M, Van Steirteghem A, Liebaers I. Methylation imprints of the imprint control region of the *SNRPN*-gene in human gametes and preimplantation embryos. *Hum Mol Genet* 2003;12:2873–9.
55. Ertzeid G, Storeng R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod* 2001;16:221–5.
56. Fortier AL, Lopes FL, Darricarrere N, Martel J, Trasler JM. Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta. *Hum Mol Genet* 2008;17:1653–65.
57. Van der Auwera I, D'Hooghe T. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod* 2001;16:1237–43.

58. Kolibianakis E, Bourgain C, Albano C, Osmanagaoglu K, Smitz J, Van Steirteghem A, et al. Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin releasing hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up. *Fertil Steril* 2002;78:1025–9.
59. Nikas G, Develioglou OH, Toner JP, Jones HW Jr. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod* 1999;14:787–92.
60. Chai J, Lee KF, Ng EH, Yeung WS, Ho PC. Ovarian stimulation modulates steroid receptor expression and spheroid attachment in peri-implantation endometria: studies on natural and stimulated cycles. *Fertil Steril* 2011;96: 764–8.
61. Haouzi D, Assou S, Dechanet C, Anahory T, Dechaud H, De Vos J, et al. Controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization alters endometrial receptivity in humans: protocol effects. *Biol Reprod* 2010;82:679–86.
62. Logan PC, Ponnampalam AP, Rahnema F, Lobie PE, Mitchell MD. The effect of DNA methylation inhibitor 5-Aza-20-deoxycytidine on human endometrial stromal cells. *Hum Reprod* 2010;25:2859–69.
63. Rahnema F, Thompson B, Steiner M, Shafiei F, Lobie PE, Mitchell MD. Epigenetic regulation of E-cadherin controls endometrial receptivity. *Endocrinology* 2009;150:1466–72.
64. Vincent ZL, Farquhar CM, Mitchell MD, Ponnampalam AP. Expression and regulation of DNA methyltransferases in human endometrium. *Fertil Steril* 2011;95:1522–5.e1.
65. Yamagata Y, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Tamura I, Tamura H, et al. Aberrant DNA methylation status in human uterine leiomyoma. *Mol Hum Reprod* 2009;15:259–67.
66. Ding YB, He JL, Liu XQ, Chen XM, Long CL, Wang YX. Expression of DNA methyltransferases in the mouse uterus during early pregnancy and susceptibility to dietary folate deficiency. *Reproduction* 2012;144:91–100.
67. Ding YB, Long CL, Liu XQ, Chen XM, Guo LR, Xia YY, et al. 5-Aza-20-deoxycytidine leads to reduced embryo implantation and reduced expression of DNA methyltransferases and essential endometrial genes. *PLoS One* 2012;7: e45364.
68. Yin LJ, Zhang Y, Lv PP, He WH, WuYT, Liu AX, et al. Insufficient maintenance DNA methylation is associated with abnormal embryonic development. *BMC Med* 2012;10:26.
69. de Waal E, Yamazaki Y, Ingale P, Bartolomei MS, Yanagimachi R, McCarrey JR. Gonadotropin stimulation contributes to an increased incidence of epimutations in ICSI-derived mice. *Hum Mol Genet* 2012;21: 4460–72.
70. Davis TL, Yang GJ, McCarrey JR, Bartolomei MS. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet* 2000;9:2885–94.

71. de Waal E, Yamazaki Y, Ingale P, Bartolomei M, Yanagimachi R, McCarrey JR. Primary epimutations introduced during intracytoplasmic sperm injection (ICSI) are corrected by germline-specific epigenetic reprogramming. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:4163–8.
72. Stouder C, Paoloni-Giacobino A. Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the methylation pattern of imprinted genes in the mouse sperm. *Reproduction* 2010;139:373–9.
73. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 2005;308: 1466–9.
74. Baerwald AR, Walker RA, Pierson RA. Growth rates of ovarian follicles during natural menstrual cycles, oral contraception cycles, and ovarian stimulation cycles. *Fertil Steril* 2009;91:440–9.
75. Minocherhomji S, Athalye AS, Madon PF, Kulkarni D, Uttamchandani SA, Parikh FR. A case-control study identifying chromosomal polymorphic variations as forms of epigenetic alterations associated with the infertility phenotype. *Fertil Steril* 2009;92:88–95.
76. Denomme MM, Mann MR. Genomic imprints as a model for the analysis of epigenetic stability during assisted reproductive technologies. *Reproduction* 2012;144:393–409.
77. Bourc'his D, Proudhon C. Sexual dimorphism in parental imprint ontogeny and contribution to embryonic development. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 282:87–94.