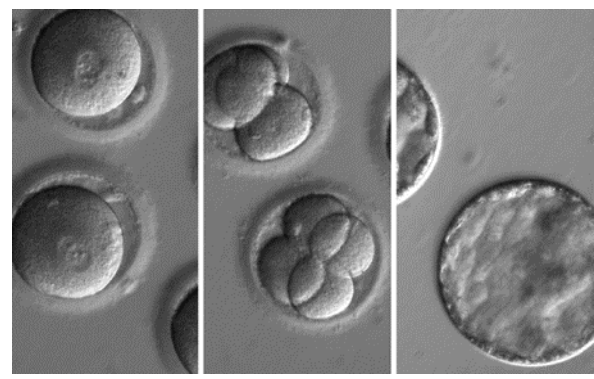




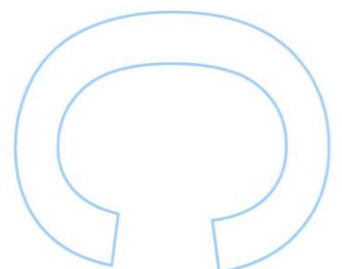
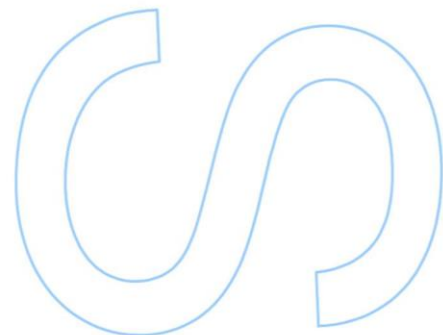
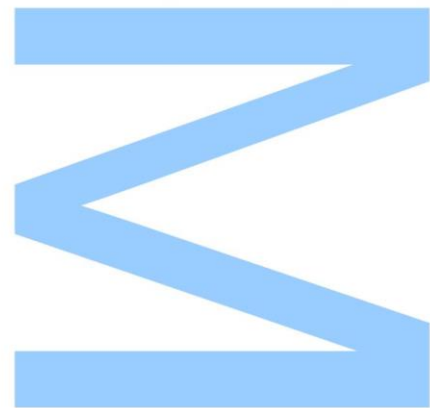
Impacto dos estilos de vida de casais inférteis na qualidade dos gâmetas e embriões

Ione Gonçalves Tavares dos Reis

Mestrado em Biologia Celular e Molecular
Departamento de Biologia
2018/2019

Orientador

Vasco Manuel Leal Martins de Almeida, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

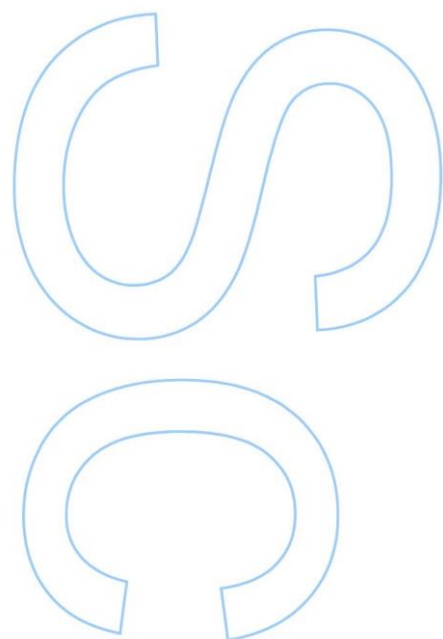
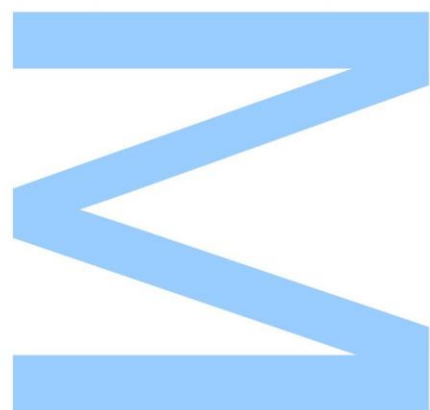




Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Vasco Almeida, por me abrir as portas. O meu muito obrigada pela confiança depositada em mim, pela simpatia constante e, sobretudo, por ter estado disponível para ajudar-me desde o primeiro momento que lhe demonstrei interesse na área, foi sem dúvida o que me permitiu chegar até aqui.

Aos doutores Joaquim Gonçalves e Jorge Braga pela oportunidade de estagiar no CEIE e cooperar nos seus tratamentos.

Às embriologistas Isabel Damião e Sara Oliveira. Isabel, obrigada por me ter ensinado tudo com atenção e paciência e pelo carinho com que me acolheu desde o início, considero-a uma amiga. Sara, obrigada pelas dicas e por incentivar-me a dar sempre o meu melhor. Vocês as duas fizeram-me sentir parte da equipa.

Aos colegas de Mestrado, Cristiana Lopes e Artur Santos, os meus companheiros ao longo destes dois anos, que ajudaram no que podiam, que ouviram os desabafos e que tornaram tudo muito mais divertido.

À minha mãe, aos meus três irmãos e à toda a minha família portuguesa. Tenho muito que vos agradecer, pois, de uma maneira ou de outra, todos vocês contribuíram para que eu crescesse e me tornasse o que sou hoje.

À minha tia do coração, Inocy Moreira, que mesmo no Brasil, está sempre presente. Obrigada por te assegurares que nunca me falta nada.

Ao meu melhor amigo e namorado, João Faria, o maior dos agradecimentos. Este trabalho não era de todo possível sem a tua ajuda. Obrigada por partilhares comigo o teu conhecimento, obrigada por acreditares em mim e obrigada por não me deixares ir abaixo. Não poderia ter melhor pessoa ao meu lado.

E por fim, um agradecimento especial ao meu querido avô, Zé Carioca, a quem dedico este trabalho. Tive a sorte de ser escolhida como tua neta e viver contigo a infância mais feliz que uma criança pode ter. Cresci com as recordações desses dias e tudo aquilo que aprendi contigo. Obrigada pelo amor incondicional.

Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo	VII
Abstract.....	VIII
Lista de figuras e tabelas.....	IX
Unidades e abreviaturas.....	XIII
1. Introdução.....	1
1.1. Prevalência de infertilidade	1
1.2. Procriação Medicamente Assistida	2
1.3. Seleção embrionária e a tecnologia de <i>time-lapse</i>	3
1.4. As principais causas de infertilidade	5
1.5. Estilos de vida e infertilidade	7
1.5.1. Tabaco	8
1.5.2. Álcool	9
1.5.3. Cafeína.....	10
1.5.4. Excesso de peso.....	10
1.2. Objetivos	11
2. Materiais e Métodos	13
2.1. Avaliação espermática	13
2.2. Processamento seminal	15
2.3. Colheita de ovócitos	16
2.4. Ciclos de ICSI.....	16
2.5. Ciclos de FIV	18
2.6. Avaliação da morfologia embrionária	18
2.7. Questionários sobre os estilos de vida.....	21
2.8. Análise estatística dos dados.....	21
2.8.1. Variáveis de resposta representativas de fertilidade	21
2.8.2. Seleção das variáveis que influenciam a fertilidade	22

2.8.3.	Modelação dos dados	22
3.	Resultados.....	26
3.1.	Resultados descritivos da amostra	26
3.1.1.	Hábitos de consumo entre sexos	26
3.1.2.	Sucesso de fecundação e qualidade embrionária para as diferentes técnicas	27
3.2.	Resultados dos modelos	28
3.2.1.	Morfologia espermática.....	28
3.2.2.	Taxa de sucesso da fecundação	30
3.2.3.	Qualidade embrionária ao 3º e 5º dia do desenvolvimento	33
4.	Discussão dos resultados.....	38
4.1.	Resultados descritivos da amostra	38
4.1.1.	Hábitos de consumo entre sexos.....	38
4.1.2.	Sucesso da fecundação e qualidade embrionária para as diferentes técnicas	38
4.2.	Resultados dos modelos	40
4.2.1.	Morfologia espermática.....	40
4.2.2.	Taxa de sucesso da fecundação	41
4.2.3.	Qualidade embrionária ao 3º e 5º dia do desenvolvimento	42
5.	Conclusão.....	46
6.	Bibliografia.....	48
7.	Anexos.....	83

Resumo

A infertilidade atinge cerca de 10 a 15% dos casais em idade fértil, com uma incidência crescente de acordo com a idade. Vários fatores femininos e/ou masculinos podem estar na origem do quadro de infertilidade do casal. De entre eles, uma das potenciais causas que tem vindo a ganhar cada vez mais relevância são os estilos de vida.

Apesar da multiplicidade de estudos já desenvolvidos, verifica-se que o impacto dos estilos de vida na fertilidade é em geral avaliado individualmente e apenas num dos membros do casal, estando em falta na bibliografia uma abordagem que considere o potencial efeito de interações entre estilos de vida e a contribuição de ambos os membros do casal. De forma a procurar colmatar esta lacuna, este trabalho avaliou o impacto isolado e conjunto dos hábitos de consumo de álcool, tabaco e café, bem como do excesso de peso e idade, tendo em conta os seus efeitos e interações nos pacientes individualmente e em casal. Para isso, 77 pacientes responderam a um questionário sobre os seus hábitos de consumo e características fisiológicas, o que permitiu posteriormente avaliar o efeito destes nos indicadores representativos de fertilidade escolhidos: a morfologia espermática para os pacientes do sexo masculino, a taxa de sucesso da fecundação para as pacientes do sexo feminino e a qualidade embrionária ao 3º e 5º dia para o casal.

Observou-se um efeito significativo do álcool isolado ($\chi^2 = 8.15$; $p < 0.05$), da interação do café e tabaco ($\chi^2 = 13.67$; $p < 0.01$) e do café com o álcool ($\chi^2 = 9.23$; $p < 0.05$) na morfologia espermática; uma aproximação de significância ($SQ = 0.25$; $p = 0.067$) do tabaco e café no sucesso da fecundação; um efeito significativo da variável idade ($SQ = 5.51$; $p < 0.05$) e consumo de álcool ($SQ = 13.78$; $p < 0.001$) e também uma forte tendência da interação entre o tabaco, café e álcool ($SQ = 4.6$; $p = 0.062$) na qualidade embrionária ao 3º dia; e por fim, um efeito significativo de todas os hábitos de consumo, IMC e idade ($SQ_{\text{tabaco}} = 5.11$; $SQ_{\text{álcool}} = 5.91$; $SQ_{\text{IMC}} = 3.81$; $SQ_{\text{idade}} = 6.65$; $p < 0.05$) na qualidade embrionária ao 5º dia. Assim, verificou-se que a influência dos hábitos de consumo na fertilidade foi consistentemente demonstrada. Constata-se ainda a importância da integração simultânea dos diferentes hábitos de consumo do indivíduo e do casal, tal como dos fatores fisiológicos como o IMC e a idade para determinar o impacto destes na qualidade dos gametas e embriões resultantes.

Palavras-chave: FIV; estilos de vida; infertilidade conjugal; gametas; desenvolvimento embrionário.

Abstract

Infertility affects about 10 to 15% of couples of childbearing age, with an increasing incidence varying with age. Several female and/or male factors may be behind the couple's infertility framework. Among them, one of the potential causes that has become increasingly relevant is lifestyle.

Despite a multitude of studies already developed, the impact of lifestyles on fertility is generally assessed individually and only in one of the couple's members, resulting in a gap in literature of an approach that considers the potential effect of interactions between lifestyles and the contribution of both partners in a couple. In order to address this gap, this dissertation aimed to evaluate both the isolated and combined impact of alcohol, tobacco and coffee consumption habits, as well as overweight and age, taking into account their effects and interactions on individuals and couples. To do so, 77 patients answered a questionnaire about their consumption habits and physiological characteristics, which later allowed to evaluate their effect on the chosen representative fertility indicators: sperm morphology for male patients, success rate of fertilization for female patients and embryo quality on the 3rd and 5th day for the couple. Significant effects of alcohol by itself ($\chi^2 = 8.15$; $p < 0.05$), the interaction of coffee and tobacco ($\chi^2 = 13.67$; $p < 0.01$) and coffee with alcohol ($\chi^2 = 9.23$; $p < 0.05$) on sperm morphology were observed; near-significance ($SQ = 0.25$; $p = 0.067$) of tobacco and coffee in the success of fertilization; a significant effect of the variable age ($SQ = 5.51$; $p < 0.05$) and alcohol consumption ($SQ = 13.78$; $p < 0.001$) and also a strong trend of the interaction between tobacco, coffee and alcohol ($SQ = 4.6$; $p = 0.062$) in embryo quality on the 3rd day were also obtained; finally, a significant effect of all drinking habits, BMI and age ($SQ_{tobacco} = 5.11$; $SQ_{alcohol} = 5.91$; $SQ_{BMI} = 3.81$; $SQ_{age} = 6.65$; $p < 0.05$) was found on embryo quality at day 5. Thus, the influence of drinking habits on fertility was consistently demonstrated. It should also be noted the importance of the simultaneous integration of the different consumption habits of the individual and the couple, as well as physiological factors such as BMI and age to determine their impact on the quality of gametes and resulting embryos.

Keywords: IVF; lifestyle; marital infertility; gametes; embryo development.

Lista de figuras e tabelas

Métodos

Tabela 1. Valores de referência para os três parâmetros seminais escolhidos (concentração, motilidade e morfologia). A classificação geral da amostra foi atribuída tendo em conta a classificação dos três parâmetros em isolado. A classificação 2 não foi atribuída para a morfologia, já que amostra é considerada de má qualidade para valores de morfologia abaixo da referência, não havendo um nível intermédio como acontece com os outros dois parâmetros.

Tabela 2. Classificação da qualidade embrionária ao 3º dia de desenvolvimento com base em critérios morfológicos.

Tabela 3. Classe de blastocistos no que diz respeito aos 3 critérios morfológicos considerados.

Tabela 4. Classificação da qualidade embrionária ao 5º dia de desenvolvimento com base em critérios morfológicos. O sistema de classificação da qualidade de blastocistos combina a classe da expansão, seguido da classe da massa celular interna e por fim a classe da trofoectoderme.

Tabela 5. Variáveis (explicativas e de resposta) consideradas para este estudo, com respetiva descrição, tipo de variável e método de obtenção.

Resultados

Figura 1. Diagramas de caixa representando as diferenças entre sexos para os diferentes hábitos de consumo, a) tabaco; b) álcool; e c) café, todos classificados de 1 a 3. As mulheres (F) estão representadas a cinzento e os homens (M) a preto. As caixas representam os valores concentrados entre 25 e 75% da amostra e as linhas representam barras de erro.

Figura 2. Diagramas de caixa representando as diferenças entre técnicas de inseminação para: a) taxa de sucesso de fecundação ovocitária; b) qualidade

embrionária ao 3º. A FIV está representada a cinzento e ICSI a preto. As caixas representam os valores concentrados entre 25 e 75% da amostra e as linhas representam barras de erro.

Figura 3. Efeitos significativos previstos pelo modelo selecionado representados por diagramas de caixas de a) a c) e por uma curva de regressão para d). Está representada a relação entre a morfologia espermática e: a) interação do consumo de tabaco com o de álcool; b) interação do consumo de álcool com o café; c) consumo de álcool apenas; e d) a idade estandardizada para a amostra. As caixas representam intervalos de confiança a 95% e a linha azul o valor médio.

Figura 4. Efeitos previstos pelo modelo selecionado representados por diagramas de caixas. Está representada a relação entre a taxa de sucesso da fecundação e: a) consumo de tabaco; e b) interação do consumo de tabaco com o café. As caixas representam intervalos de confiança a 95% e a linha azul o valor médio.

Figura 5. Efeitos previstos pelo melhor modelo selecionado representados por diagramas de caixas ou linha de regressão. Está representada a relação entre a qualidade embrionária ao 3º dia e: a) consumo de álcool; b) idade (estandardizada); e c) a interação de três vias entre o tabaco, café e álcool, representado pela interação entre consumo de café e álcool para o menor (c1) e maior (c2) nível de consumo de tabaco, visto ser a diferença de níveis em que se obteve significância (Tabela s3). As caixas representam intervalos de confiança a 95% e a linha azul o valor médio.

Figura 6. Efeitos previstos pelo melhor modelo selecionado representados por linhas de regressão ou diagramas de caixa. Está representada a relação entre a qualidade embrionária ao 5º dia e: a) idade (estandardizada); b) IMC (estandardizado); c) consumo de tabaco; e d) consumo de álcool. As caixas representam intervalos de confiança a 95% e a linha azul o valor médio.

Tabela 6. Análise dos componentes principais para prever a variação da qualidade morfológica espermática nos indivíduos amostrados. São apresentados: a estatística de contraste associada a uma distribuição de χ^2 e graus de liberdade (gl) para cada parâmetro, assim como o *p-value* correspondente. Os símbolos “*” e “.” Representam significância ou proximidade de significância, respetivamente.

Tabela 7. Análise de variância dos componentes principais para prever a variação da taxa de sucesso da fecundação nos indivíduos amostrados. São apresentados: a soma dos quadrados, a estatística de contraste associada a uma distribuição de F (Fischer) e graus de liberdade (gl) para cada parâmetro, assim como o p -value correspondente. Os símbolos “*” e “.” Representam significância ou proximidade de significância, respetivamente.

Tabela 8. Análise de variância dos componentes principais para prever a qualidade embrionária ao 3º dia resultante dos indivíduos amostrados. São apresentados: a soma dos quadrados (SQ), a estatística de contraste associada a uma distribuição de F (Fischer) e graus de liberdade (gl) para cada parâmetro, assim como o p -value correspondente. Os símbolos “*” e “.” Representam significância ou proximidade de significância, respetivamente.

Tabela 9. Análise de variância dos componentes principais para prever a qualidade embrionária ao 5º dia resultante dos indivíduos amostrados. São apresentados: a soma dos quadrados, a estatística de contraste associada a uma distribuição de F (Fischer) e graus de liberdade (gl) para cada parâmetro, assim como o p -value correspondente. Os símbolos “*” e “.” Representam significância ou proximidade de significância, respetivamente.

Anexos

Figura s1. Exemplo de gráficos de diagnóstico utilizados para o modelo selecionado para a qualidade embrionária ao 5º dia. São quatro resultados que revelam se o modelo é ou não bem ajustado aos dados: a) e c) representam os residuais (standardizados ou não) relativamente aos valores previstos, onde a aproximação de uma linha reta indica bom ajuste; b) representa o ajuste dos quantis teóricos aos residuais standardizados, onde a aproximação dos valores à reta tracejada representa um ajuste adequado; e d) que utiliza a *distância de Cook* para verificar se existem alguns valores individuais de residuais que possam ser problemáticos para o modelo. Como nenhum valor se aproxima da linha que representa a *distância de Cook*, esta não se encontra sequer visível, indicando novamente um bom ajuste dos residuais do modelo.

Figura s2. Questionário sobre os estilos de vida elaborado pelos autores.

Tabela s1. Melhor modelo geral linearizado selecionado com função *stepAIC* para prever a variação da qualidade morfológica espermática nos indivíduos amostrados. São apresentados: a estimativa β associada a cada parâmetro e erro padrão correspondente a esta estimativa, assim como o *z-score* e *p-value* associado a cada parâmetro. O símbolo “.” representa proximidade de significância.

Tabela s2. Melhor modelo de regressão de mínimos quadrados selecionado com função *stepAIC* para prever a variação da qualidade morfológica espermática nos indivíduos amostrados. São apresentados: a estimativa β associada a cada parâmetro e erro padrão correspondente a esta estimativa, assim como o *t-score* e *p-value* associado a cada parâmetro. O símbolo “.” representa proximidade de significância.

Tabela s3. Melhor modelo de regressão de mínimos quadrados selecionado com função *stepAIC* para prever a qualidade embrionária ao 3º dia resultante dos indivíduos amostrados. São apresentados: a estimativa β associada a cada parâmetro e erro padrão correspondente a esta estimativa, assim como o *t-score* e *p-value* associado a cada parâmetro. O símbolo “.” representa proximidade de significância.

Tabela s4. Melhor modelo de regressão de mínimos quadrados selecionado com função *stepAIC* para prever a qualidade embrionária ao 5º dia resultante dos indivíduos amostrados. São apresentados: a estimativa β associada a cada parâmetro e erro padrão correspondente a esta estimativa, assim como o *t-score* e *p-value* associado a cada parâmetro. O símbolo “.” representa proximidade de significância.

Unidades e abreviaturas

AIC – Do inglês *akaike information criterion*

CCO – Complexo *cumulus*-ovócito

CEIE – Centro de Estudo e Infertilidade e Esterilidade

FIV – Fertilização *in vitro*

GLM – Do inglês *general linear model*

gl – Graus de liberdade

GLZ – Do inglês *generalized linear model*

ICSI – Do inglês *intracytoplasmatic sperm injection*

IMC – Índice de Massa Corporal

WHO – Do inglês *World Health Organization*

PMA – Procriação Medicamente Assistida

PVP – Polyvinylpyrrolidone

Rpm – Rotações por minuto

v/v – Percentagem em volume

μL – Microlitros

mL – Mililitros

μm/s – Micrómetros por segundo

1. Introdução

A incapacidade de gerar um filho é uma adversidade que tem atingido um número crescente de casais (Rutstein & Shah, 2004). Dado as expectativas pessoais, interpessoais, sociais e religiosas, para a maioria dos homens e mulheres um filho é um projeto fundamental da vivência em casal. A sua ausência involuntária, associada aos sentimentos de perda, fracasso e exclusão que frequentemente a acompanha, pode estar na origem de diversos problemas psicológicos a longo prazo (Kraft *et al.*, 1980; Bahamondes & Makuch, 2014).

1.1. Prevalência de infertilidade

Na espécie humana, sob condições ótimas, a probabilidade máxima de ocorrência duma gravidez clinicamente reconhecida num ciclo menstrual é de 30 a 40% (Macklon *et al.*, 2002). Cerca de 50% dos casais em idade fértil têm sucesso em obter uma gravidez espontaneamente ao fim de três meses de relações sexuais regulares e desprotegidas, valor que aumenta para mais de 85% concluídos os 12 meses de tentativas (Bongaarts, 1975). O insucesso em obter uma gravidez nesse ou num maior período de relações sexuais regulares e desprotegidas é o que define infertilidade (Crosignani *et al.*, 1996). Apesar da prevalência da infertilidade ser difícil de avaliar, estudos apontam que, na população mundial, cerca de 8% a 15% dos casais em idade fértil sejam atingidos por ela, com uma provável média global de 9% (Boivin *et al.*, 2007; Chachamovich *et al.*, 2010). No entanto, esses valores diferem de acordo com a região geográfica considerada. Estima-se que a prevalência geral de infertilidade em países desenvolvidos varie entre os 6,9% e 9,3%, enquanto que, em países em desenvolvimento, a estimativa fica compreendida entre os 3,5% até aos 16,7% (Boivin *et al.*, 2007; Ombelet, 2009). Em algumas regiões do mundo, as taxas de infertilidade atingem valores ainda mais elevados, podendo chegar a 30% em algumas populações (Nachtigall, 2006; Ombelet *et al.*, 2008). Tal é particularmente verdadeiro em regiões onde a prevalência da infertilidade já é por si elevada, o que inclui o sul da Ásia, a África subsaariana, o Oriente Médio e o norte da África, a Europa Central e Oriental e a Ásia Central (Mascarenhas *et al.*, 2012).

É geralmente aceite que as tendências para taxas de fertilidade mais baixas são também um reflexo de mudanças socioeconómicas que tiveram impacto tanto na educação, como numa mais adequada e ampla utilização de métodos contraceptivos

(Te Velde *et al.*, 2002; Leridon, 2006). Para as mulheres, a disponibilidade de métodos contraceptivos hormonais permitiu-lhes terem controlo sobre a maternidade. A ligação entre a sexualidade e a reprodução que era até então uma inevitabilidade biológica, passou a ser uma questão de escolha (Van de Kaa, 1987; Bailey, 2006). Por outro lado, à medida que oportunidades educacionais, de emprego e de carreira surgiram neste processo, o comportamento reprodutivo foi fundamentalmente alterado (Van de Kaa, 1987; Goldin, 2006).

De facto, nos países desenvolvidos, associado ao aumento da expectativa de vida e aos avanços nas técnicas de reprodução assistida, surge uma tendência para que o início do planeamento familiar comece após o estabelecimento de carreiras, resultando em idades parentais mais elevadas. Devido a esse adiamento da gravidez por parte do casal (Sartorius & Nieschlag, 2009), muitos tentam ter filhos numa fase em que a fertilidade começa a diminuir (Daar & Merali, 2002).

1.2. Procriação Medicamente Assistida

Em resposta à necessidade dos casais de recorrer à ajuda médica para resolver os problemas subjacentes de fertilidade, as técnicas de Procriação Medicamente Assistida (PMA) têm vindo a ser aperfeiçoadas ao longo dos anos, criando a possibilidade de ajudar uma grande parte destes a atingir uma gravidez viável (Kovalevsky & Patrizio, 2005). Entre os tratamentos oferecidos aos casais inférteis, as técnicas de PMA estão associadas a uma maior taxa de sucesso, já que envolvem a manipulação de gametas, zigotos ou embriões para atingir uma gravidez (Bromer & Seli, 2008).

A Fertilização *in vitro* (FIV) constitui uma das técnicas de PMA disponíveis mais eficazes e compreende todo o processo que vai desde a colheita de ovócitos dos ovários da mulher, passando pela fertilização dos ovócitos *in vitro* com os espermatozoides colhidos e processados, até à transferência do(s) embrião(s) resultante(s) para o útero da paciente (Alper, 2012).

O primeiro nascimento fruto dum tratamento bem-sucedido de FIV foi relatado em 1978 (Steptoe & Edwards, 1978) e desde essa altura, o avanço tem sido contínuo de forma a desenvolver procedimentos mais eficazes e seguros para tratar os casais. Nestes últimos 40 anos, juntamente com o progresso nas áreas da estimulação ovárica, cultura embrionária e criobiologia, também foi introduzida a técnica de FIV com recurso à Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI –

intracytoplasmatic sperm injection) e ainda foram desenvolvidas técnicas para a remoção de corpos polares, blastómeros e células da trofoectoderme para a realização de análises genéticas e a identificação de doenças congénitas (Healy *et al.*, 2017). De acordo com o relatório de 2018 do Comité Internacional para a Monitorização de Técnicas de Reprodução Assistida, a estimativa é de que, em 2011, cerca de 2 milhões de ciclos foram realizados em todo o mundo e, nesse mesmo ano, mais de 500.000 crianças nascidas foram concebidas *in vitro* (Adamson *et al.*, 2018).

Ainda assim, mais avanços na área continuam a ser necessários. Embora muitos aspetos das técnicas de FIV tenham melhorado significativamente, as taxas de implantação ainda são baixas e menos de 50% dos tratamentos resultam em gravidez (Nyboe Andersen *et al.*, 2008; Kupka *et al.*, 2014; Sunderam *et al.*, 2018). A incapacidade de selecionar os embriões com maior potencial reprodutivo parece ser, pelo menos em parte, responsável por esse insucesso (Kovalevsky & Patrizio, 2005; Seli *et al.*, 2010).

1.3. Seleção embrionária e a tecnologia de *time-lapse*

Um passo crítico em todos os procedimentos de fertilização *in vitro* é a cultura dos ovócitos fecundados e a subsequente seleção de um ou mais embriões para transferência (Cruz *et al.*, 2011). Em todos os ciclos é, portanto, fundamental identificar embriões viáveis de alta qualidade com o maior potencial de implantação. Apesar de várias estratégias para a seleção embrionária terem sido propostas, tais como perfis metabolómicos e *screening* genético (Bromer & Seli, 2008), as características morfológicas têm sido as mais amplamente utilizadas na seleção de embriões de excelência (Kaser & Racowsky, 2014) por apresentarem uma relação significativa com o potencial de implantação. Em laboratório, a avaliação morfológica foca-se no momento imediatamente antes da transferência que por norma ocorre no dia 3 (fase de clivagem) ou no dia 5 (fase de blastocisto) do desenvolvimento embrionário (Boiso *et al.*, 2002), fases onde é possível observar um maior número de parâmetros preditivos da qualidade embrionária (Racowsky *et al.*, 2003). No entanto, apesar da introdução de sistemas de *score* embrionário (Cummins *et al.*, 1986; Steer *et al.*, 1992; Fisch *et al.*, 2001; Terriou *et al.*, 2001; De Placido *et al.*, 2002) a relação entre a morfologia no dia 3, as características do blastocisto no dia 5 e a viabilidade embrionária permanece mal definida.

Tradicionalmente, a avaliação embrionária tem sido feita através da observação ao microscópio da sua morfologia por parte dum embriologista (Nakahara *et al.*, 2010). Contudo, a preocupação com o efeito do manuseamento dos embriões fora do ambiente controlado das estufas de incubação, uma vez que é possível a ocorrência de alterações ao nível da temperatura e pH, bem como nas percentagens de CO₂ e O₂, limitam tempo e o número de observações que se podem realizar (Montag *et al.*, 2011; Desai *et al.*, 2014) e, por conseguinte, a informação obtida em relação ao desenvolvimento embrionário e as mudanças morfológicas que sofrem durante o período de incubação ficam restritas aos poucos momentos de observação (Kaser & Racowsky, 2014). Sendo o desenvolvimento embrionário um processo ativo, a classificação de embriões baseada apenas em aspetos morfológicos estáticos e dependentes grandemente dos tempos de observação limitam a informação disponível ao embriologista e leva a que eventualmente não se observem processos importantes de curta duração (Cruz *et al.*, 2011). Além disso, a natureza dinâmica e gradual da mudança na morfologia celular pode ocultar eventos que só se tornam visíveis quando as imagens são condensadas num filme contínuo e coerente (Payne *et al.*, 1997).

Com o surgimento da tecnologia de *time-lapse*, estas desvantagens têm sido ultrapassadas. A tecnologia de *time-lapse* consiste na captura de imagens estáticas em intervalos de tempo curtos e definidos que são depois compiladas numa sequência conjugada, de forma a criar um vídeo acelerado do desenvolvimento (Landecker, 2006; Wallberg *et al.*, 2016). Associado à embriologia, essa tecnologia pretende minimizar perturbações no ambiente de cultura ao integrar a incubação e a aquisição de imagem dos embriões em um único sistema (Cruz *et al.*, 2011). A sua utilização como rotina em laboratórios de PMA permite uma monitorização contínua da cultura (Kirkegaard *et al.*, 2015), o que torna possível o estudo de todo o desenvolvimento embrionário e não apenas de momentos isolados deste, e ainda avaliar os parâmetros morfocinéticos do embrião (Herrero & Meseguer, 2013). A monitorização através do *time-lapse* permite que um fenómeno observado em um momento específico seja vinculado diretamente à capacidade de desenvolvimento e à implantação do embrião. De facto, numerosos estudos sugerem que o *timing* de alguns eventos específicos – formação dos pronúcleos, singamia, divisão precoce, intervalos da divisão celular, sincronismo da divisão celular e início da formação de blastocisto – são indicadores do potencial de desenvolvimento e de implantação do embrião, com grande utilidade na seleção dos embriões mais capazes de implantar após transferência e de continuar o seu desenvolvimento *in utero* (Cruz *et al.*, 2011; Chamayou *et al.*, 2013; Conaghan *et al.*, 2013; Desai *et al.*, 2014; Kirkegaard *et al.*, 2015).

1.4. As principais causas de infertilidade

O processo de envelhecimento reprodutivo humano é ditado sobretudo pela diminuição gradual da fertilidade feminina com a idade, caracterizada tanto por uma redução do número de ovócitos disponíveis, como numa perda de qualidade ovocitária (Broekmans *et al.*, 2007). Durante a vida fetal, os ovários contêm a totalidade de folículos (ovócitos rodeados por células da granulosa) que deverão atender às necessidades reprodutivas da mulher ao longo da sua vida. Devido à extinção antes do nascimento das células germinativas primordiais femininas precursoras dos gametas, é estabelecido um limite máximo para a vida reprodutiva da mulher (Faddy & Gosden, 1996). Entre a fase fetal e o nascimento da mulher, o número total de ovócitos que os ovários contêm decresce drasticamente dos 6-7 milhões iniciais para 1-2 milhões (Markstrom *et al.*, 2002). Após o nascimento essa alta taxa de perda ovocitária desacelera, de modo que no momento da menarca, marco do início do período reprodutivo, a mulher permanece ainda com cerca de 300 mil a 400 mil ovócitos (Broekmans *et al.*, 2007). Durante os anos reprodutivos, o declínio no número de ovócitos estabiliza em cerca de mil por mês (Bayer, 2012). No entanto, finalizado o período de fertilidade ideal que vai dos 18 anos de idade até mais ou menos os 30 anos, a perda ovocitária volta a acelerar e, a partir dos 37 anos, a quantidade de ovócitos em declínio torna-se significativamente elevada (te Velde & Pearson, 2002). Essa alta taxa de perda ovocitária mantém-se até por volta dos 50 anos, idade onde a reserva ovárica disponível atinge os mil ou menos folículos, um número insuficiente para sustentar o processo hormonal cíclico necessário para a ocorrência da menstruação (Broekmans *et al.*, 2007).

Paralelamente à perda progressiva do número de folículos, também a qualidade dos ovócitos diminui a partir dos 30 anos. A frequência de anomalias cromossômicas aumenta rapidamente com o aumento da idade materna, de tal forma que a maioria dos embriões são cromossomicamente anormais em mulheres acima dos 37 anos de idade, contendo todas as combinações possíveis de monossomias e trissomias (te Velde & Pearson, 2002).

Acredita-se que as aneuploidias cromossômicas sejam as responsáveis pelo aumento substancial da frequência de abortamentos espontâneos com a idade (Spandorfer *et al.*, 2004). Esse aumento na frequência de abortamentos espontâneos é uma consequência da reduzida fertilidade feminina que se observa anos antes da menopausa: embora entre os 40 e os 50 anos ainda restem folículos suficientes para

sustentar a ocorrência da menstruação, a maioria destes ovócitos são anómalos e por isso, mesmo que fecundem e implantem, a probabilidade duma gravidez prosseguir com sucesso é substancialmente mais baixa nessas condições (Broekmans *et al.*, 2007).

A não disjunção durante a meiose é o principal mecanismo que explica a ocorrência da maioria das aneuploidias nos embriões (Whitman-Elia & Baxley, 2001; Bayer, 2012). Por outro lado, a observação da composição cromossómica de blastómeros de embriões de mulheres mais velhas revela uma alta frequência de mosaicismo cromossómico, demonstrando que a não-disjunção mitótica durante o desenvolvimento inicial dos embriões também é um efeito associado ao envelhecimento dos ovócitos (Wells & Delhanty, 2000). A diminuição da qualidade ovocitária com a idade pode ser ainda resultado de possíveis diferenças entre células da linha germinativa no momento em que são formadas durante a vida fetal, do acumular de danos nos ovócitos no decorrer da vida da mulher ou mesmo de mudanças na qualidade das células da granulosa ao redor do ovócito (te Velde & Pearson, 2002; Warburton, 2005).

Contrariamente à mulher, os homens geralmente não apresentam uma interrupção clara da capacidade reprodutiva (Plas *et al.*, 2000). No entanto, várias alterações fisiológicas que afetam o sistema endócrino e a função testicular são observadas com a idade. Essas alterações resultam na diminuição da função testicular e das células de Leydig, o que consequentemente afeta a produção de testosterona (Kovac *et al.*, 2013). Entre os parâmetros seminais, o volume, a percentagem de espermatozoides móveis e a percentagem de morfologia normal são os mais consistentemente relatados como alterados em homens mais velhos (Brahem *et al.*, 2011). A idade também pode ter um impacto na integridade do DNA espermático ao elevar a taxa de fragmentação deste, o que por sua vez afeta o potencial fértil, aumenta o risco de abortos recorrentes e diminui a probabilidade duma implantação bem-sucedida (Benchabib *et al.*, 2007; Bayer, 2012; Ferraz, 2014).

Além da idade, existe uma multiplicidade de outros fatores femininos e/ou masculinos que podem estar na origem do quadro de infertilidade do casal, tais como disfunções ovulatórias, anomalias cromossómicas, fatores espermáticos, fármacos, doenças, traumas pélvicos, estilos de vida, entre outros (Guzick *et al.*, 2001; Bath *et al.*, 2002; Partridge *et al.*, 2004; Clementini *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2005; Holoch and Bruce, 2010; Grigorescu *et al.*, 2014).

O fator masculino está presente em cerca de 30 a 40% das situações de infertilidade (Whitman-Elia & Baxley, 2001). O fator mais frequentes no homem é o varicocele, com uma incidência de cerca de 15% na população em geral e de aproximadamente 40% nos homens inférteis (Bayer & Alper, 2012). Outro fator masculino de infertilidade são as causas genéticas, com uma incidência de cerca de 30% (Whitman-Elia & Baxley, 2001). Dentro do fator feminino, o fator tubo-peritoneal representa cerca de 30 a 40% dos casos de infertilidade, caracterizados por alterações na integridade tubária, na cavidade uterina e a presença de aderências pélvicas que comprometem a anatomia do trato genital feminino (Brugo-Olmedo *et al.*, 2001). As disfunções ovulatórias que compreendem o desenvolvimento, a maturação e a rutura do folículo, são responsáveis por cerca de 25% dos casos (O'Flynn, 2014). Já o fator cervical está presente em 10% dos casos de infertilidade feminina, existindo ainda outras causas cuja percentagem não é tão significativa (5%) (Whitman-Elia & Baxley, 2001).

Cerca de 30 a 40% dos casais que procuram tratamento exibem uma combinação de fatores tanto masculinos, como femininos, e por esse motivo é necessário considerar ambos os membros do casal aquando do estudo da fertilidade (O'Flynn, 2014). Aproximadamente 10% dos casais, mesmo depois de todos os fatores referidos serem avaliados, não apresentam quaisquer alterações objetivas que levem a um diagnóstico definitivo. Estes são então considerados pacientes com infertilidade inexplicada ou idiopática (Brugo-Olmedo *et al.*, 2001).

1.5. Estilos de vida e infertilidade

A influência dos estilos de vida na fertilidade tem recebido uma atenção crescente nos últimos anos, inclusive em relação aos efeitos destes nos resultados das técnicas de PMA (Homan *et al.*, 2007; Braga *et al.*, 2015). Tendencialmente, a infertilidade conjugal deverá aumentar como consequência da prática de determinados comportamentos de risco (Vasconcelos *et al.*, 2014) que podem repercutir-se negativamente na capacidade reprodutiva e estar na origem de alterações na qualidade dos gametas e embriões resultantes (Van Voorhis *et al.*, 1996; Joesbury *et al.*, 1998; Rubes *et al.*, 1998; Zenzes *et al.*, 1999; Klonoff-Cohen *et al.*, 2002; Klonoff-Cohen *et al.*, 2003), qualidade esta que é determinante para o sucesso do tratamento. Desta forma, torna-se relevante explorar mais detalhadamente o impacto individual e conjunto dos diferentes hábitos na fertilidade.

1.5.1. Tabaco

Embora seja amplamente reconhecido como um risco para a saúde e uma das mais importantes causas de morte prematura, o consumo de tabaco continua prevalente na sociedade (Zenzes, 2000; Veeranki *et al.*, 2014).

No que diz respeito à fertilidade, observou-se que o tabaco é o fator que maior risco representa (Macklon *et al.*, 2009). Estudos epidemiológicos em mulheres em idade reprodutiva mostraram que o consumo de tabaco altera a função ovárica e pode estar na origem do fenómeno de falência ovárica prematura, fazendo com que as mulheres fumadoras atinjam a menopausa mais cedo que as não fumadoras (Cramer *et al.*, 1995; Mikkelsen *et al.*, 2007; Macaluso *et al.*, 2010). Está associado a distúrbios da função menstrual, como oligomenorreia e sangramento intermenstrual (Hornsby *et al.*, 1998; Windham *et al.*, 1999; Soares & Melo, 2008) e a níveis hormonais alterados (Zumoff *et al.*, 1990). Está também demonstrado a ocorrência de alterações nas trompas e no útero, levando a uma maior incidência de abortamentos e gravidez ectópica (Ankum *et al.*, 1996; Saraiya *et al.*, 1998; Soares *et al.*, 2007; Waylen *et al.*, 2009). Além disso, encontra-se ainda ligado a modificações descritas na zona pelúcida – através do espessamento desta camada, dificultando a fecundação – e escurecimento do citoplasma, podendo os ovócitos fecundados apresentar um desenvolvimento mais lento e clivagens anormais (Wdowiak *et al.*, 2013).

Já no homem, apesar de nem sempre se verificarem alterações (Trummer *et al.*, 2002), tem sido no geral observado uma redução da qualidade espermática e da capacidade fertilizante dos espermatozoides como consequência do consumo de tabaco (Sharma *et al.*, 2016). A associação com o declínio da qualidade espermática tem sido observada na motilidade, concentração e morfologia, que são os parâmetros mais utilizados em ambiente clínico para avaliar a fertilidade masculina (Vine *et al.*, 1996; Zavos *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 2000; Wallock *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Macaluso *et al.*, 2010). Sabe-se ainda que o fumo do tabaco é rico em radicais livres que aumentam o stress oxidativo no trato reprodutivo masculino (Shi *et al.*, 2001; Tremellen, 2008; Gunes *et al.*, 2018). Esse aspeto tem sido associado a um aumento significativo de espermatozoides com DNA fragmentado e/ou mutado (Saleh *et al.*, 2002; Sepaniak *et al.*, 2006), o que por sua vez pode impedir a fertilização do ovócito e o desenvolvimento do embrião (Mostafa, 2010).

1.5.2. Álcool

O consumo excessivo de álcool tem sido relacionado ao desenvolvimento de patologias na maioria dos sistemas corporais humanos, tais como o sistema reprodutivo (Lieber, 1990; Dunphy *et al.*, 1991).

O álcool pode afetar o potencial reprodutivo por dificultar a obtenção duma gravidez e aumentar o risco teratogénico (Streissguth *et al.*, 1980; Sobral *et al.*, 2012). Por causa disso, é recomendado o estabelecimento de limites máximos de ingestão semanal a casais que estejam a tentar engravidar (O'Flynn, 2014), já que o consumo moderado aparenta não ter influência na taxa de concepção (Gulekli *et al.*, 2009).

No que ao homem diz respeito, o álcool pode comprometer o funcionamento gonádico por interferir com a função do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonádico (Cicero *et al.*, 1979; Härkönen & Ylikahri, 1983). A razão entre o estradiol livre e a testosterona livre é modificada pelo consumo de álcool (Hansen *et al.*, 2012) e observa-se mais frequentemente casos de paragem da espermatogénese e de síndrome de só células de Sertoli (Pajarinen *et al.*, 1996).

Embora nem todos os estudos estejam de acordo (Teijón *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2012), alguns destes sugerem uma associação negativa entre o consumo de álcool e a qualidade seminal (Martini *et al.*, 2004; Muthusami & Chinnaswamy, 2005; Gaur *et al.*, 2010). Dentro dos parâmetros seminais estudados, na sua generalidade, os resultados indicam que o consumo de álcool tem um efeito negativo no volume seminal e na morfologia espermática (Ricci *et al.*, 2017). O alcoolismo pode ainda causar atrofia testicular, impotência e redução da libido (Boyden & Pamenter, 1983).

Comparativamente aos homens, os efeitos adversos do álcool na saúde das mulheres é observado para níveis de consumo mais baixos, o que pode ser consequência da menor quantidade total de água corporal das mulheres, das diferenças no metabolismo do álcool entre ambos os sexos ou do impacto do álcool nos níveis de estrogénio e progesterona (Bradley *et al.*, 1998). Essas variações dos níveis de estrogénio e progesterona estão na origem de disfunções ovulatórias, como a ocorrência de ciclos anovulatórios, amenorreia e alterações da fase lútea (Gulekli *et al.*, 2009). A ingestão de álcool por parte das mulheres tem sido também relacionada com taxas de implantação embrionária mais baixas e desenvolvimento de embriões de qualidade inferior (Wdowiak *et al.*, 2014; Alvarez, 2015), assim como um elevado risco de abortamento espontâneo e morte fetal (Sobral *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2013). Estudos conduzidos num grupo de 217 mulheres com problemas reprodutivos mostraram que o consumo de álcool um ano antes do ciclo de FIV resultou na redução do número de ovócitos puncionados, o consumo um mês antes causou um aumento

no número de falhas em alcançar a gravidez, enquanto o consumo de álcool uma semana antes aumentou o risco da ocorrência de aborto após a FIV (Klonoff-Cohen *et al.*, 2003).

1.5.3. Cafeína

A cafeína é uma substância presente em diversas bebidas, como cafés, chás, refrigerantes e bebidas energéticas (Ricci *et al.*, 2017). Quando ingerida, a cafeína atravessa facilmente as membranas biológicas e rapidamente se distribui por todo o corpo, tendo sido já encontrada no leite materno, no embrião e no recém-nascido (Monteiro *et al.*, 2016). Esta pode influenciar a fertilidade de ambos os membros do casal ao afetar a ovulação, as características menstruais ou a qualidade espermática (Wesselink *et al.*, 2016).

Na mulher, a ingestão de cafeína em excesso pode aumentar o risco de ciclos menstruais curtos (Fenster *et al.*, 1999) e reduzir os níveis de estrogénio e progesterona na fase lútea (Schliep *et al.*, 2012), o que por sua vez pode aumentar o risco de abortamento espontâneo (Hahn *et al.*, 2015). Evidências sugerem ainda que o consumo de cafeína está associado a um aumento do tempo de concepção (Bolumar *et al.*, 1997), endometriose e morte fetal *in utero* (Sobral *et al.*, 2012). No entanto, apesar dos efeitos da ingestão de cafeína na fertilidade da mulher terem sido estudados extensivamente, os resultados são inconsistentes. Alguns estudos epidemiológicos encontraram pouca relação entre a ingestão de cafeína e a fertilidade (Hakim *et al.* 1998; Chavarro *et al.*, 2009; Hatch *et al.*, 2012), enquanto outros identificaram relações inversas (Wilcox *et al.*, 1988; Jensen *et al.*, 1998) ou positivas (Florack *et al.*, 1994).

Em relação aos homens, as evidências são ainda mais limitadas e controversas, mas alguns estudos mostraram que a ingestão de cafeína está associada à redução da concentração e número de espermatozoides (Jensen *et al.*, 2010) e com o aumento dos níveis de testosterona (Svartberg *et al.*, 2003; Ramlau-Hansen *et al.*, 2008).

1.5.4. Excesso de peso

O excesso de peso não só está ligado ao aumento da incidência de doenças crónicas (Must *et al.*, 1999), como também foi demonstrado que aumenta o risco de desenvolvimento de problemas reprodutivos (Catalano, 2007). Os efeitos adversos deste na fertilidade podem, no entanto, ser reversíveis com a perda de peso (Norman *et al.*, 2004), sendo por esse motivo aconselhável a sua diminuição para índices de

massa corporal (IMC) apropriados, de forma a maximizar o sucesso dos ciclos de tratamento e diminuir os riscos associados (Bellver & Pellicer, 2004; American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013). A obesidade na mulher (IMC superior a 29) tem sido relacionada ao desenvolvimento da síndrome do ovário policístico, distúrbios menstruais e ovulatórios, dificuldades na implantação, falhas no tratamento de infertilidade e múltiplas complicações na gravidez, como diabetes gestacional, pré-eclâmpsia e macrosomia fetal (Diamanti-Kandarakis & Bergiele, 2001; Villamor & Cnattingius, 2006; Chavarro *et al.*, 2007; Metwally *et al.*, 2008; Macaluso *et al.*, 2010). As pacientes com sobrepeso submetidas aos ciclos de PMA geralmente requerem dosagens maiores de gonadotrofina para a estimulação ovárica (Loh *et al.*, 2002), produzem menos ovócitos maduros (Crosignani *et al.*, 1994), têm uma qualidade embrionária menor (Jones *et al.*, 2000) e uma maior incidência de abortos espontâneos (Bellver & Pellicer, 2004). As consequências reprodutivas do excesso de peso nos homens foram menos avaliadas, no entanto estudos indicam que o sobrepeso masculino (IMC maior que 25) leva a alterações do perfil hormonal, devido a uma redução significativa dos níveis de testosterona (Fejes *et al.*, 2006; Aggerholm *et al.*, 2008). Também foi descrito que o sobrepeso e a obesidade estão relacionados a níveis mais baixos de inibina B (Jensen *et al.*, 2004; Aggerholm *et al.*, 2008; Pauli *et al.*, 2008), um marcador da função das células de Sertoli e espermatogénese. De facto, embora não esteja totalmente claro até que ponto essas alterações hormonais afetam o potencial reprodutivo (Chavarro *et al.*, 2010), homens com IMC elevado têm demonstrado alterações na quantidade e qualidade dos espermatozoides (Jensen *et al.*, 2004; Magnusdottir *et al.*, 2005; Fejes *et al.*, 2006; Kort *et al.*, 2006).

1.2. Objetivos

Verifica-se que, apesar da crescente investigação relativa ao impacto dos estilos de vida na fertilidade, estes são geralmente abordados individualmente (Klonoff-Cohen *et al.*, 2003; Mikkelsen *et al.*, 2007; Ricci *et al.*, 2017), salvo um reduzido número de exceções (Martini *et al.*, 2004; Anifandis *et al.*, 2014; de Jong *et al.*, 2014), e olhando apenas para um dos membros do casal. Restam, portanto, lacunas no conhecimento relativo ao impacto conjunto dos estilos de vida na fertilidade, assim como o efeito que ambos os membros do casal possam ter em simultâneo no desenvolvimento embrionário. Com este estudo, pretende-se: i) avaliar o impacto na fertilidade de vários hábitos de consumo de cada elemento do casal; ii) entender o potencial efeito aditivo ou sinérgico que poderá ocorrer com a conjugação de mais do que um hábito de

consumo em simultâneo; iii) identificar consequências adicionais na fertilidade que poderão advir do envolvimento em conjunto de ambos os membros do casal.

2. Materiais e Métodos

2.1. Avaliação espermática

As amostras seminais foram obtidas de pacientes que recorreram ao CEIE para a realização de técnicas de PMA. Todas as colheitas foram feitas por masturbação e as respectivas instruções para o processo de colheita foram explicadas ao paciente, de acordo com as normas estabelecidas pela *World Health Organization* (WHO, 2010). As amostras foram colhidas num frasco de recolha de fluidos biológicos estéril, devidamente identificados com o nome do paciente e o seu número de identificação. Aquando da realização do espermograma, a amostra seminal foi avaliada, segundo os critérios propostos pela WHO (2010). Para a classificação da qualidade espermática, no contexto deste trabalho, apenas os valores de referência da concentração, motilidade e morfologia espermática foram considerados.

A avaliação da motilidade corresponde à determinação quantitativa e qualitativa do movimento dos espermatozoides. A contagem e determinação da motilidade foi feita depositando-se uma alíquota de 10 µL de sémen numa lâmina, seguida da contagem de 200 espermatozoides, com o auxílio dum microscópio ótico de campo claro, na ampliação de 400 vezes. A contagem foi feita em duplicado. Com a ajuda dum contador de célula, os 200 espermatozoides contados foram classificados como: espermatozoides progressivos rápidos que se movem ativamente, tanto linearmente, como em grande círculo, com velocidade de 25 µm/s ou superior (equivalente a meia cauda ou 5 comprimentos de cabeça dum espermatozoide por segundo); espermatozoides progressivos lentos que avançam a uma velocidade superior a 5 µm/s (equivalente ao comprimento de uma cabeça de espermatozoide por segundo), mas inferior 25 µm/s; espermatozoides móveis *in situ* que têm movimento, mas não progridem, movimentando-se a uma velocidade inferior que 5 µm/s; e espermatozoides imóveis que apresentam uma ausência completa de movimento. A percentagem de espermatozoides de cada classe foi então calculada. A amostra de sémen foi considerada normal se a percentagem de espermatozoides móveis progressivos rápidos (a) e lentos (b) adicionada à percentagem de espermatozoides móveis *in situ* (c) tiver correspondido a 40% ou mais e a percentagem de progressivos rápidos e lentos (a+b) for de 32% ou mais.

A determinação da concentração espermática por mililitro foi feita através da utilização da câmara de Neubauer. Um volume de 10 µL de amostra seminal + fixador são adicionados à câmara por capilaridade e, após 30 minutos, procede-se à contagem dos espermatozoides e determinação da concentração. O valor normal de referência é de 15 milhões/ml de amostra.

Por fim, a morfologia foi estudada através de esfregaços em lâmina de 10 µL de sémen fresco, fixados com metanol e corados com os corantes Papanicolau e Shorr. Foram contados pelo menos 200 espermatozoides ao microscópio ótico de campo claro, usando a objetiva de óleo de imersão (1000x), com base em critérios de classificação da WHO (2010). A amostra é considerada normal para esse parâmetro quando apresenta uma quantidade igual ou superior a 4% de espermatozoides com formas normais.

Tendo isso em conta, no âmbito deste trabalho, as amostras seminais foram classificadas como sendo de boa qualidade (3) quando apresentaram os valores mínimos de referência considerados normais pela WHO: concentração de 15 milhões/ml, motilidade a+b+c igual a 40% e a+b igual a 32% e morfologia de 4%; qualidade razoável (2) quando apresentaram um dos parâmetros ou mais abaixo dos valores de referência: concentração entre 10 a 15 milhões/ml, motilidade a+b+c entre 20% a 40% e a+b igual a 20% e morfologia de 4%; ou de má qualidade (1) quando apresentaram um dos parâmetros ou mais abaixo dos valores de referência: concentração menor que 10 milhões/ml, motilidade a+b+c inferior a 20% e a+b igual a 20% e morfologia inferior a 4%. Com o objetivo de identificar possíveis alterações em cada um dos parâmetros, para cada paciente, os três parâmetros foram classificados individualmente em 1, 2 ou 3, segundo os valores de referência referidos (**tabela 1**). Feito isso, tendo em conta as três classificações em conjunto, a classificação geral da qualidade espermática foi por sua vez atribuída.

Tabela 1. Valores de referência para os três parâmetros seminais escolhidos (concentração, motilidade e morfologia). A classificação geral da amostra foi atribuída tendo em conta a classificação dos três parâmetros em isolado. A classificação 2 não foi atribuída para a morfologia, já que amostra é considerada de má qualidade para valores de morfologia abaixo da referência, não havendo um nível intermédio como acontece com os outros dois parâmetros.

Classificação			
	Concentração	Motilidade	Morfologia
3 (bom)	≥ 15 milhões/ml	≥ 40% móveis	≥ 4%
2 (razoável)	10 a 15 milhões/ml	20% a 40% móveis	

1 (mau) < 10 milhões/ml < 20% móveis < 4%

2.2. Processamento seminal

Aquando do início do ciclo, após o puncionamento dos ovócitos, a amostra seminal já analisada foi obtida para o tratamento, como descrito na secção 2.1. A amostra obtida foi então desta vez processada no laboratório de Andrologia, de forma a separar os espermatozoides normais dos fatores descapacitantes presentes no plasma seminal e ainda reter os espermatozoides imóveis e/ou anormais e outras células que possam estar presentes. Numa câmara de fluxo laminar, em condições de assepsia, foram preparados dois gradientes de densidade descontínuos, em 2 tubos falcon diferentes, ambos com o volume final de 1 ml. Num tubo falcon adicionou-se 0,4 ml de gradiente de sílica (SpermGrad™, Vitrolife) + 0,6 de meio de cultura (G-IVF PLUS™, Vitrolife), perfazendo uma concentração final de 40% (v/v). Noutro tubo falcon adicionou-se 0,8 ml de gradiente de sílica + 0,2 ml de meio de cultura, perfazendo uma concentração final de 80% (v/v). Com ajuda duma seringa, o gradiente de 80% foi transferido cuidadosamente para baixo do gradiente de 40%. A amostra, depois de liquefeita em estufa a 35°C, foi homogeneizada e colocada com auxílio duma pipeta de Pasteur no topo dos dois gradientes, sendo o tubo de seguida centrifugado a 1000 rpm, durante 25 minutos, a 35°C. Depois da centrifugação, retirou-se e descartou-se com uma pipeta de Pasteur o sobrenadante que contém o plasma seminal, restos celulares e os espermatozoides imóveis e/ou anómalos e transferiu-se o *pellet* resultante, rico em espermatozoides móveis e normais, para um novo tubo falcon limpo. A esse tubo adicionou-se 2 ml de meio de cultura previamente aquecido a 37°C. O novo tubo foi centrifugado a 1000 rpm, durante 10 minutos, a 35°C para lavagem do *pellet*, assegurando a remoção dos restos dos gradientes de densidade. Depois disso, o sobrenadante foi então novamente aspirado e descartado, mantendo-se o menor volume possível de meio acima do *pellet*. Sem perturbar o sedimento, foram adicionados até um máximo de 0,5 ml de meio de cultura (dependente da concentração e da técnica a utilizar) para *swim up*. Nesta fase do processamento, o tubo com os espermatozoides já preparados foi colocado à temperatura ambiente, em posição inclinada (ângulo de 45°), durante cerca de 30 minutos, para permitir a migração dos espermatozoides com motilidade progressiva para a superfície, espermatozoides estes que foram preferencialmente utilizados nas técnicas.

2.3. Colheita de ovócitos

A aspiração folicular do ovário para colheita de ovócitos das pacientes em ciclo foi realizada por punção transvaginal dos folículos, sob controlo ecográfico com uma sonda com agulha acoplada, por parte dum médico especializado, numa das salas de tratamento do Centro. Nesse processo, o líquido folicular foi aspirado por vácuo para tubos de poliestireno, colocados num bloco metálico de suporte, aquecido a 37°C.

No final da punção, os tubos foram transportados para o laboratório de Embriologia, onde, numa bancada de fluxo laminar de superfície aquecida a 37°C e com recurso a um estereomicroscópio, o líquido folicular de cada tubo foi transferido para uma placa de Petri, procedendo-se à triagem dos complexos *cumulus*-ovócito (CCO) presentes. Os CCO encontrados foram transferidos para uma placa de 4 poços a 37°C com 500µl de meio tamponado em cada poço (G-MOPS PLUS™, Vitrolife) e cobertos com parafina líquida para remoção de restos celulares e vestígios de sangue e posteriormente distribuídos por uma placa de 4 poços com 500µl de meio de cultura em cada poço cobertos com parafina líquida, previamente aquecida a 37°C. Os CCO foram então incubados em estufa a 37°C, 6% de CO₂ e 5% de O₂, até a altura da inseminação, caso a técnica utilizada tenha sido uma FIV ou até a desnudação das células circundantes, caso a técnica utilizada tenha sido uma ICSI.

2.4. Ciclos de ICSI

Em ciclos de ICSI, depois de concluído o período de incubação mínimo de 3 horas desde a colheita dos ovócitos, efetuou-se a desnudação dos CCO sob um estereomicroscópio em câmara de fluxo laminar de superfície aquecida, numa placa de 4 poços, previamente incubada a 37°C, durante 30 a 60 minutos, contendo um poço com 70µl de meio com enzima para remoção das células do *cumulus* (HYASE-10X™, Vitrolife) e coberto com parafina líquida (OVOIL™, Vitrolife) e 3 poços com 500µl de meio tamponado, também cobertos com parafina líquida. Os CCO foram primeiro colocados no poço com enzima e repetidamente aspirados durante 30-40 segundos até as células circundantes estarem dispersas. De seguida, foram sucessivamente e cuidadosamente aspirados com a pipeta de desnudação ao longo dos 3 poços com meio tamponado, de modo a remover a totalidade das células circundantes e os vestígios de enzima. Depois de desnudados, os ovócitos foram avaliados quanto à sua maturidade e qualidade ao microscópio invertido, sendo posteriormente incubados a 37°C, 5% de O₂ e 6% de CO₂, por um período mínimo de 1 hora, até à realização da ICSI. Os ovócitos foram classificados morfológicamente como de boa qualidade (1), de qualidade razoável (2) ou de má qualidade (3),

segundo os Critérios de Istambul (Alpha & *European Society of Human Reproduction and Embryology*, 2011). Foram considerados de categoria 1 aqueles que apresentaram estrutura esférica com zona pelúcida regular, citoplasma uniforme e glóbulo polar com tamanho apropriado; de categoria 2 os que apresentaram espaço perivitelino ligeiramente aumentado, citoplasma granular e/ou glóbulo polar fragmentado; de categoria 3 aqueles que apresentaram estrutura muito irregular, glóbulo polar gigante, espaço perivitelino aumentado ou com inclusões e/ou presença de vacúolos. Para serem classificados como de categoria 2 ou 3 tinham necessariamente que apresentar um ou mais que um dos parâmetros mencionados alterados.

Foi necessário preparar a placa de ICSI 20 a 30 minutos antes da microinjeção. Na região mais à direita duma placa de Petri colocaram-se pequenas gotas de meio tamponado (cerca de 5 µl), previamente aquecido a 37°C. Na região mais à esquerda colocaram-se duas gotas de meio PVP (aproximadamente 10 µl) que foram espalhadas na placa com a ajuda da ponta da micropipeta, formando duas linhas lado a lado. Após a sua preparação, a placa foi imediatamente coberta com parafina líquida e colocada na estufa a 37°C. Momentos antes da microinjeção, os gâmetas foram adicionados à placa. Uma alíquota de volume dependente da concentração dos espermatozoides processados foi colocada na periferia da primeira gota de PVP, enquanto os ovócitos maduros em metafase II foram colocados individualmente nas gotas de meio tamponado. Por fim, para se iniciar a microinjeção, a placa de ICSI foi colocada na platina aquecida a 37°C do microscópio invertido, equipado com um sistema de micromanipuladores e micropipetas próprio para a realização da técnica. Nesta fase, a pipeta de microinjeção foi baixada, com auxílio dos micromanipuladores, para a gota mais periférica de PVP contendo os espermatozoides. Esta foi focada, de forma a ser possível selecionar e aspirar um espermatozoide com uma boa morfologia. O espermatozoide aspirado foi transferido para a gota adjacente de PVP, onde foi colocado numa posição perpendicular relativamente à pipeta de microinjeção para, através da aplicação dum golpe seco entre a pipeta e o fundo da placa de Petri, na zona abaixo da peça intermédia do espermatozoide, esmagar a cauda, imobilizando o espermatozoide.

O espermatozoide imobilizado foi aspirado pela cauda e posicionado na extremidade da pipeta ICSI, sendo a micropipeta imediatamente movida para a gota onde o ovócito a microinjetar foi depositado. O ovócito foi posicionado com o glóbulo polar às 6 ou às 12 horas e fixado através de uma ligeira sucção por parte da pipeta *holding* e, de seguida, a pipeta ICSI foi aproximada do ovócito e posicionada às 3 horas. Nesta fase a pipeta ICSI foi muito lentamente empurrada de modo a perfurar a zona pelúcida e a

membrana citoplasmática do ovócito. Após a pipeta atingir a superfície interna da membrana às 9 horas, aspirou-se lentamente uma pequena quantidade de citoplasma que foi novamente injetada no ovócito juntamente com o espermatozoide. O procedimento termina com a retirada lenta da pipeta ICSI e a liberação do ovócito da pipeta *holding*. Todo este processo foi repetido até todos os ovócitos maduros do ciclo em questão serem microinjetados.

Os ovócitos microinjetados foram por fim transferidos para as respectivas placas de *time-lapse*, previamente preparadas com 80 µl em cada um dos três poços de meio de cultura próprio (G-TL™, Vitrolife) e coberta com 4 ml de parafina líquida. As placas, devidamente identificadas, foram colocadas dentro do aparelho de *time-lapse*, onde permaneceram até à transferência.

2.5. Ciclos de FIV

Em ciclos de FIV os CCO puncionados foram mantidos na placa de 4 poços com meio de cultura e cobertos com parafina líquida a 37°C numa atmosfera de 6% CO₂ e 5% O₂ até ao momento da inseminação, cerca de 4 a 6 horas após punção. No momento da inseminação, sob o estereomicroscópio e em bancada de superfície aquecida, adicionou-se o volume determinado de amostra seminal (concentração de aproximadamente 50.000 a 100.000 espermatozoides móveis/ml) ao meio de cultura dos poços onde foram mantidos os CCO (não mais de cinco CCO por poço). Após inseminação, os ovócitos foram incubados juntamente com os espermatozoides nas mesmas condições anteriores. Cerca de 17±1 horas depois, foi avaliado o resultado da fertilização pela presença dos dois pró-núcleos e pela extrusão do 2º glóbulo polar, após a lavagem e desnudação mecânica dos ovócitos numa outra placa de 4 poços com meio de cultura. Os pré-zigotos foram então transferidos para as respectivas placas de *time-lapse*, previamente preparadas como descrito anteriormente e incubados no aparelho até à transferência.

2.6. Avaliação da morfologia embrionária

Com o auxílio do equipamento de *time-lapse* Geri+ os embriões foram classificados em dois momentos distintos: ao 3º dia de desenvolvimento (68h +/- 1h) e ao 5º dia de desenvolvimento (116h +/- 2h). Seguindo uma versão adaptada dos Critérios de Istambul (Ver **tabela 2; 3; 4**; Alpha & *European Society of Human Reproduction and Embryology*, 2011), os embriões obtidos foram considerados de boa qualidade (3), de qualidade razoável (2) ou de má qualidade (1).

Ao 3º dia, os embriões foram considerados de categoria 3 se apresentavam 8 células, menos de 10% de fragmentação, tamanho específico dos blastómeros para o estado celular e isento de multinucleação; de categoria 2 se apresentavam de 9 a 11 células e/ou 10 a 25% de fragmentação, mantendo-se os blastómeros de tamanho apropriado e sem evidência de multinucleação; e, por fim, de categoria 1 se apresentavam mais de 11 células ou menos de 8 células, grau de fragmentação superior a 25%, tamanho inadequado de todos os blastómeros e/ou presença de multinucleação. Para serem classificados como de categoria 2 ou 1 foi necessário apresentarem um ou mais que um dos parâmetros alterados (**tabela 2**).

Já ao 5º dia, em fase de blastocisto, a classificação é dependente das características de duas formações celulares embrionárias distintas: a massa celular interna (de grau 1 quando proeminente, bem definida, com muitas células compactadas e aderentes firmemente entre si; de grau 2 quando bem definida, mas com muitas células mal agrupadas; grau 3 quando mal definida e com poucas células) e a trofoectoderme (de grau 1 com muitas células, formando um epitélio coeso; grau 2 com poucas células, formando um epitélio disperso; grau 3 com poucas células). O maior ou menor grau de expansão do blastocisto também foi avaliado, podendo ser um blastocisto inicial (grau 1), blastocisto (grau 2), blastocisto expandido (grau 3) ou blastocisto em eclosão/eclodido (grau 4). Tendo isso em conta e segundo os Critérios de Istambul, os embriões foram classificados como de boa qualidade, qualidade razoável e má qualidade, como definido na **tabela 3 e 4**.

Tabela 2. Classificação da qualidade embrionária ao 3º dia de desenvolvimento com base em critérios morfológicos.

	Classificação		
	3ª (bom)	2ª (razoável)	1ª (mau)
<i>Nº de células</i>	7-8	≥9	≤6
<i>Fragmentação (%)</i>	< 10	10 a 25	>25
<i>Simetria</i>	Presente	Presente	Maioritariamente ausente
<i>Multinucleação</i>	Ausente	Ausente	Presente

3a – Para o embrião ser classificado como de classe 3 é necessário que os 4 parâmetros estejam de acordo com o descrito na tabela.

2b – Para o embrião ser classificado como de classe 2 apenas pode apresentar alterações no nº de células e/ou na % de fragmentação.

1c – Para o embrião ser classificado como de classe 1 é necessário apresentar pelo menos um dos 4 parâmetros alterados como descrito na tabela.

Tabela 3. Classe de blastocistos no que diz respeito aos três critérios morfológicos considerados.

	Classe	Descrição
<i>Expansão</i>	BL1	Blastocisto inicial
	BL2	Blastocisto
	BL3	Blastocisto expandido
	BL4	Blastocisto em eclosão ou eclodido
<i>Massa celular interna</i>	1	Proeminente, bem definida, com muitas células compactadas e aderentes firmemente entre si
	2	Bem definida, mas com muitas células mal agrupadas
	3	Mal definida e com poucas células
<i>Trofoectoderme</i>	1	Muitas células, formando um epitélio coeso
	2	Poucas células, formando um epitélio disperso
	3	Poucas células

Tabela 4. Classificação da qualidade embrionária ao 5º dia de desenvolvimento com base em critérios morfológicos. O sistema de classificação da qualidade de blastocistos combina a classe da expansão, seguido da classe da massa celular interna e por fim a classe da trofoectoderme.

Classificação		
3 (bom)	2 (razoável)	1 (mau)
BL2-1-1	BL1	BL2-2-3
BL3-1-1		BL2-3-2
BL4-1-1	BL2-1-2	BL2-3-3
	BL2-2-1	
	BL2-2-2	BL3-2-3
		BL3-3-2
	BL3-1-2	BL3-3-3
	BL3-2-1	
	BL3-2-2	BL4-2-3
		BL4-3-2
	BL4-2-1	BL4-3-3
	BL4-1-2	
	BL4-2-2	

2.7. Questionários sobre os estilos de vida

Os questionários foram entregues desde o início do mês de fevereiro de 2019 até meados de julho. Todos os pacientes amostrados responderam a um questionário elaborado pelos autores (**Figura s2**) aquando da realização do ciclo. O mesmo questionário foi atribuído a ambos os membros do casal. Os casos em que apenas um dos membros do casal respondeu ao questionário foram considerados casos *single*. As perguntas do questionário foram concebidas de forma a conhecer os hábitos que os pacientes mantêm atualmente e os que já tiveram anteriormente. As questões abrangeram o consumo de tabaco, álcool, café e drogas recreativas e as respetivas frequências de consumo.

2.8. Análise estatística dos dados

2.8.1. Variáveis de resposta representativas de fertilidade

De forma a avaliar o impacto dos estilos de vida, foram selecionados diferentes indicadores representativos da fertilidade, tanto ao nível individual, como de casal (**Tabela 1**).

No homem, dos três parâmetros considerados, apenas considerou-se como variável de resposta a qualidade morfológica dos espermatozoides (*morfologia espermática*). Dado que a morfologia não apresenta um nível intermédio de classificação, nesta fase atribuiu-se um valor de 1 ou 0 conforme os pacientes apresentaram uma morfologia normal ou alterada, respetivamente, de forma a simplificar a análise. A motilidade e a concentração não entraram na análise, já que praticamente não houve pacientes com valores de referência alterados para estes dois parâmetros.

Na mulher, considerou-se como variável representativa da fertilidade a *taxa de sucesso da fecundação*, dada pela fração de ovócitos fecundados sobre o total de ovócitos puncionados/maduros. Inicialmente, testou-se também um indicador de qualidade de ovócitos. No entanto, devido a esta poder apenas ser avaliada em casos de ICSI, o *n* de amostra foi demasiado baixo para o método de análise aplicado.

No casal, duas variáveis foram consideradas: *qualidade embrionária ao 3º e 5º dia*. Estes dois dias foram escolhidos por corresponderem a fases bastante distintas entre si, mas ambas muito representativas do desenvolvimento embrionário (Martin, 2000), por ser possível observar um número maior de características morfológicas importantes (Racowsky *et al.*, 2003) e por a transferência para o útero ser

preferencialmente realizada em um destes dois dias do desenvolvimento no Centro onde o estudo foi desenvolvido.

2.8.2. Seleção das variáveis que influenciam a fertilidade

Dos dados recolhidos em inquérito, foram descartadas as respostas relativas ao consumo de drogas devido a i) uma utilização inferior a 5% da amostragem (3 em 70 indivíduos); ii) possibilidade mais elevada da amostra sofrer de um enviesamento, devido a uma complexa interação de fatores como falta de standardização, características exigidas pelo estudo e limitações do próprio método de inquirir, normalmente associados a inquéritos que pretendem investigar uso de drogas (Hochhauser, 1979). Assim, consideraram-se apenas os hábitos de consumo de álcool, tabaco e café, tendo em conta três diferentes níveis de intensidade de consumo para cada. Adicionalmente, teve-se também em conta o IMC e a idade por serem fatores em geral considerados determinantes para a fertilidade (**Tabela 5**).

2.8.3. Modelação dos dados

2.8.3.1. Preparação dos dados e análise descritiva

Antes de aplicar cada uma das análises de regressão pretendidas, foi necessário standardizar as variáveis explicativas contínuas (*IMC* e *idade*), de forma a todos os valores se encontrarem na mesma ordem de magnitude e assim obter coeficientes de regressão de interpretação razoável (Zuur *et al.*, 2009). Posteriormente, utilizou-se um teste de correlação τ de Kendall para avaliar a independência entre as variáveis contínuas (*IMC* e *idade*). Verificou-se que estas estão relacionadas nos homens ($\tau = 2.52$; $p < 0.05$), mas não nas mulheres ($\tau = 0.39$; $p = 0.70$), pelo que se mantiveram ambas.

Adicionalmente, procedeu-se a uma breve análise descritiva que permitiu quantificar as diferenças observadas entre os dois sexos para os hábitos de consumo, assim como as diferenças observadas entre técnicas de inseminação (*ICSI* e *FIV*) para as variáveis: *taxa de sucesso* e *embriões ao 3º dia*. Para tal aplicaram-se testes de normalidade de distribuição (Shapiro-Wilks) e, conforme as variáveis demonstrassem uma distribuição paramétrica ou não, aplicou-se o teste *t* de Student ou teste Mann-Whitney, respetivamente (Quinn & Keough, 2002). Para visualizar estas relações, utilizou-se a função *ggboxplot* do package *ggpubr* (version 0.2.2; Kassambara, 2017).

2.8.3.2. Análises de regressão

Para verificar a relação existente entre as variáveis explicativas selecionadas e cada variável de resposta aplicaram-se modelos de regressão de mínimos quadrados (GLM – *general linear model*) que permite inferir a relação linear que existe entre a variável dependente e uma ou várias variáveis explicativas, tanto categóricas, como contínuas (Zuur *et al.*, 2009). A fórmula de um modelo linear é a seguinte:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_n X_n + \epsilon$$

Onde Y é o vetor com os valores correspondentes à variável dependente, β_0 é o *intercept* do modelo, $\beta_1 \dots \beta_n$ correspondem aos vetores dos coeficientes do modelo para cada variável explicativa, $X_1 \dots X_n$ são os vetores com os valores de cada variável independente (podendo ser um valor, caso a variável seja contínua ou vários caso esta seja categórica) e ϵ é o vetor dos erros residuais do modelo, que corresponde à diferença entre os valores observados e aqueles previstos pelo modelo (Zuur *et al.*, 2009).

Adicionalmente, no caso da modelação da morfologia espermática, foi necessário utilizar um modelo linear generalizado (GLZ – *generalized linear model*), que é uma generalização do GLM em situações em que possa existir uma relação não linear entre os fatores preditivos e a variável de resposta e os residuais não sigam uma distribuição normal (Nelder & Wedderburn, 1972), sendo muito frequentemente utilizados em dados com distribuição binomial, como é o caso da variável *morfologia espermática* (apenas tem duas possibilidades de acontecimento, 0 – qualidade alterada; 1 – qualidade normal). Neste caso, é necessário especificar a família de distribuição da variável de resposta e utilizar uma função de ligação que permite linearizar a relação, de forma a poder ser modelada a relação entre variáveis (Zuur *et al.*, 2009). Este modelo pode ser sumariado da seguinte forma:

$$g(Y) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_n X_n + \epsilon$$

onde Y corresponde a fórmula do GLM e $g()$ é a função de ligação que permite linearizar a relação entre β e Y e que o erro ϵ siga a distribuição normal.

Para cada variável de resposta, foi estabelecido um *full model*, utilizando as funções *lm* para GLM e *glm* para o GLZ, do pacote *stats* (R Core Team, 2019) tem em conta a interação dos 3 hábitos entre si e dos dois parâmetros corporais, resumido pela seguinte fórmula:

$$\text{Variável de fertilidade} \sim \text{tabaco} \times \text{café} \times \text{álcool} + \text{IMC} \times \text{idade}$$

De seguida, utilizou-se a função *stepAIC* do package MASS (Ripley *et al.*, 2019) para uma análise bidirecional que adiciona e remove cada variável de forma aditiva ou interativa até parar no melhor modelo, isto é, aquele cuja remoção ou adição de uma variável leva a uma alteração mais drástica no *Akaike Information Criterion* (AIC). O AIC é um critério que considera a probabilidade de cada modelo relativamente a outro e o número total de parâmetros incluídos. Esta forma de seleção baseia-se no princípio da parcimónia que afirma que não são necessários modelos mais complexos (com um maior número de parâmetros) para explicar os dados, caso estes não acrescentem informação nova que seja suficientemente relevante (Burnham & Anderson, 2004). Assim, os parâmetros extra sofrem uma penalização quando acrescentados, que poderá ou não ser compensada pela quantidade de variância que é por eles explicada, e o melhor modelo é aquele com AIC inferior.

De forma a verificar se as suposições necessárias para aplicar um GLM ou GLZ foram cumpridas, efetuaram-se testes de normalidade aos residuais de cada modelo, assim como à homogeneidade da variância entre grupos (Shapiro-Wilks e Levene's test) e correlação entre variáveis (Zuur *et al.*, 2009), através das funções *shapiro.test*, *leveneTest* e *vif* dos packages *stats* e *car* (Fox *et al.*, 2012). Adicionalmente utilizou-se a função *plot* do package *stats* para efetuar um diagnóstico visual robusto do modelo selecionado (exemplo em **Figura s1**; Ritz & Streibig, 2008).

Todas as representações visuais dos resultados obtidos nos modelos foram desenvolvidas utilizando as funções *plot* ou *visreg*, encontrada no package *visreg* (Breheny & Burchett, 2019). Toda a análise foi efetuada utilizando o software R (versão 3.6.1; R Core Team, 2019).

Tabela 5. Variáveis (explicativas e de resposta) consideradas para este estudo, com respetiva descrição, tipo de variável e método de obtenção.

Variáveis	Descrição	Tipo	Fonte
De resposta			
morfologia espermática	indicador de qualidade da amostra seminal baseado em parâmetros morfológicos	Binomial	Amostra seminal
taxa de sucesso	fração de ovócitos fecundados do total de ovócitos puncionados/maduros	Contínua	Ovócitos puncionados/maduros
qualidade de embriões ao 3º e ao 5º dia	indicador de qualidade dos embriões baseado na contribuição de um score do aspeto morfológico de cada um dos embriões da amostra		Embriões em desenvolvimento
explicativas			
tabaco	Intensidade de consumo de tabaco avaliada em 3 níveis: 1 - não fumador; 2 - fuma esporadicamente/fumou com alguma frequência num período não recente; 3 - fuma diariamente ou próximo.	Categórico (3 níveis)	Inquérito (Figura s2)
álcool	Intensidade de consumo de álcool avaliada em 3 níveis: 1 - não bebe; 2 - bebe socialmente/esporadicamente; 3 - bebe diariamente ou próximo.		
café	Intensidade de consumo de café avaliada em 3 níveis: 1 - não bebe; 2 - bebe esporadicamente a 1/dia; 3 - bebe 2 ou mais/dia.		
Índice de Massa Corporal (IMC)	Índice calculado através do peso (em Kg) sobre o quadrado da altura (em m) de forma a obter um valor representativo da constituição física do indivíduo	Contínua	
idade	idade do indivíduo		

3. Resultados

3.1. Resultados descritivos da amostra

Considerando apenas indivíduos que tenham preenchido de forma inequívoca os inquéritos atribuídos, o N_{total} amostrado é de 77, dos quais 44 pertencem ao sexo feminino e 33 ao masculino, o que corresponde a N_{casal} de 33 e N_{single} de 11 indivíduos. Dentro destes, a técnica de inseminação aplicada foi a FIV em 19 casais e todos os casos *single* e a ICSI nos restantes 14 casais.

3.1.1. Hábitos de consumo entre sexos

Verificaram-se diferenças significativas para o consumo de álcool (*Wilcoxon rank* = 906; $p < 0.05$) e café (*Wilcoxon rank* = 1001.5; $p < 0.01$) entre os dois géneros, mas não para consumo de tabaco (*Wilcoxon rank* = 831; $p = 0.22$). O homem consumiu, em média, 19% mais bebidas alcoólicas que a mulher ($\bar{X}_{\text{homem}} = 2.21$; $\bar{X}_{\text{mulher}} = 1.86$, **figura 1.a**), 27% mais café ($\bar{X}_{\text{homem}} = 2.33$; $\bar{X}_{\text{mulher}} = 1.84$, **figura 1.b**) e 17% mais tabaco ($\bar{X}_{\text{homem}} = 1.79$; $\bar{X}_{\text{mulher}} = 1.52$, **figura 1.c**).

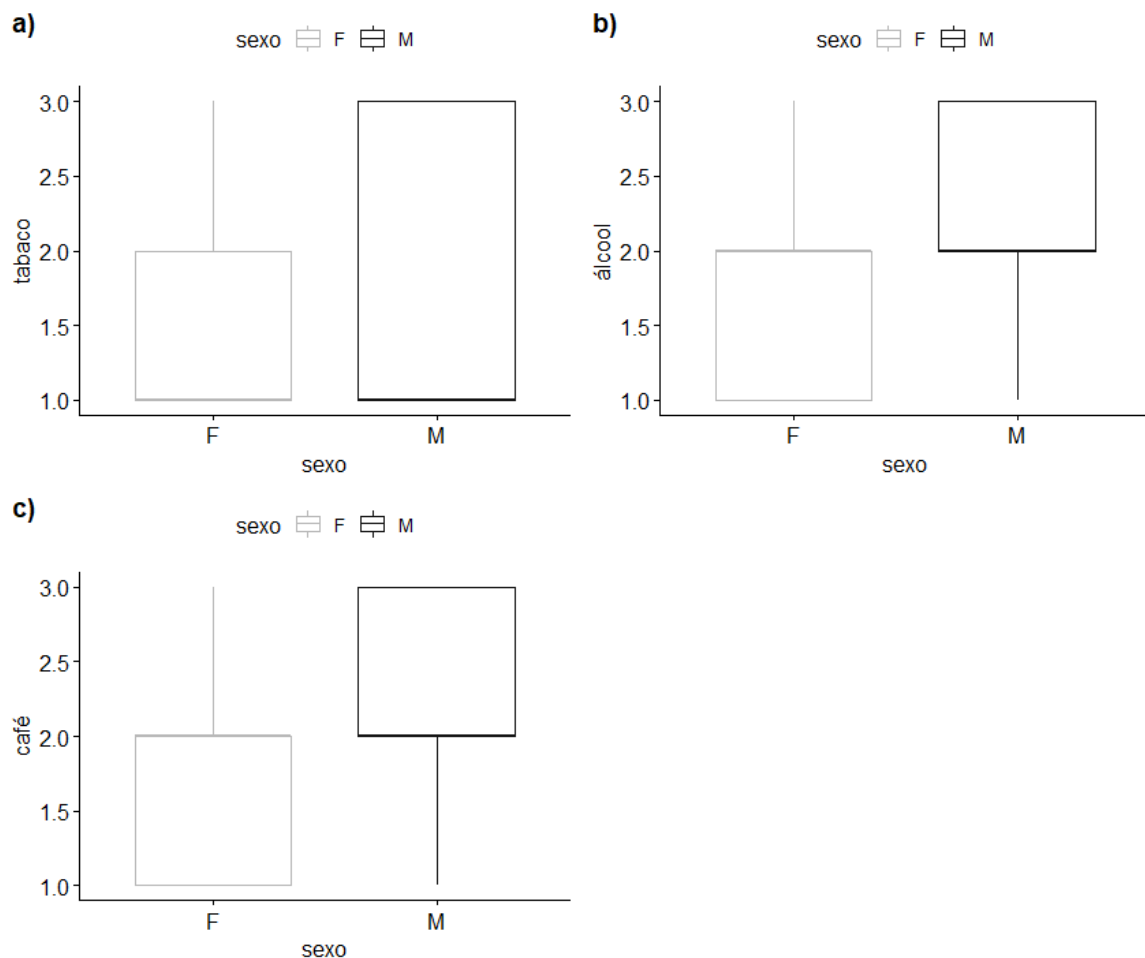


Figura 1. Diagramas de caixa representando as diferenças entre sexos para os diferentes hábitos de consumo, a) tabaco; b) álcool; e c) café, todos classificados de 1 a 3. As mulheres (F) estão representadas a cinzento e os homens (M) a preto. As caixas representam os valores concentrados entre 25 e 75% da amostra e as linhas representam barras de erro.

3.1.2. Sucesso de fecundação e qualidade embrionária para as diferentes técnicas

Tendo em conta as diferentes técnicas de inseminação aplicadas nos casais, avaliou-se a taxa de sucesso da fecundação e a qualidade embrionária ao 3º dia do desenvolvimento relativamente a cada uma das técnicas, testando a significância das potenciais diferenças. Em média, a taxa de sucesso foi ligeiramente superior utilizando FIV em oposição a ICSI ($\bar{X}_{FIV} = 0.67$; $\bar{X}_{ICSI} = 0.63$). O oposto verificou-se relativamente à qualidade embrionária, onde a ICSI obteve valores um pouco superiores ($\bar{X}_{FIV} = 1.62$; $\bar{X}_{ICSI} = 1.87$). No entanto, em nenhum dos casos se verificaram diferenças significativas entre as técnicas aplicadas ($t = 0.46$; $p = 0.65$ e $t = -1.35$; $p = 0.20$, respetivamente), o que é evidenciado na **Figura 2**.

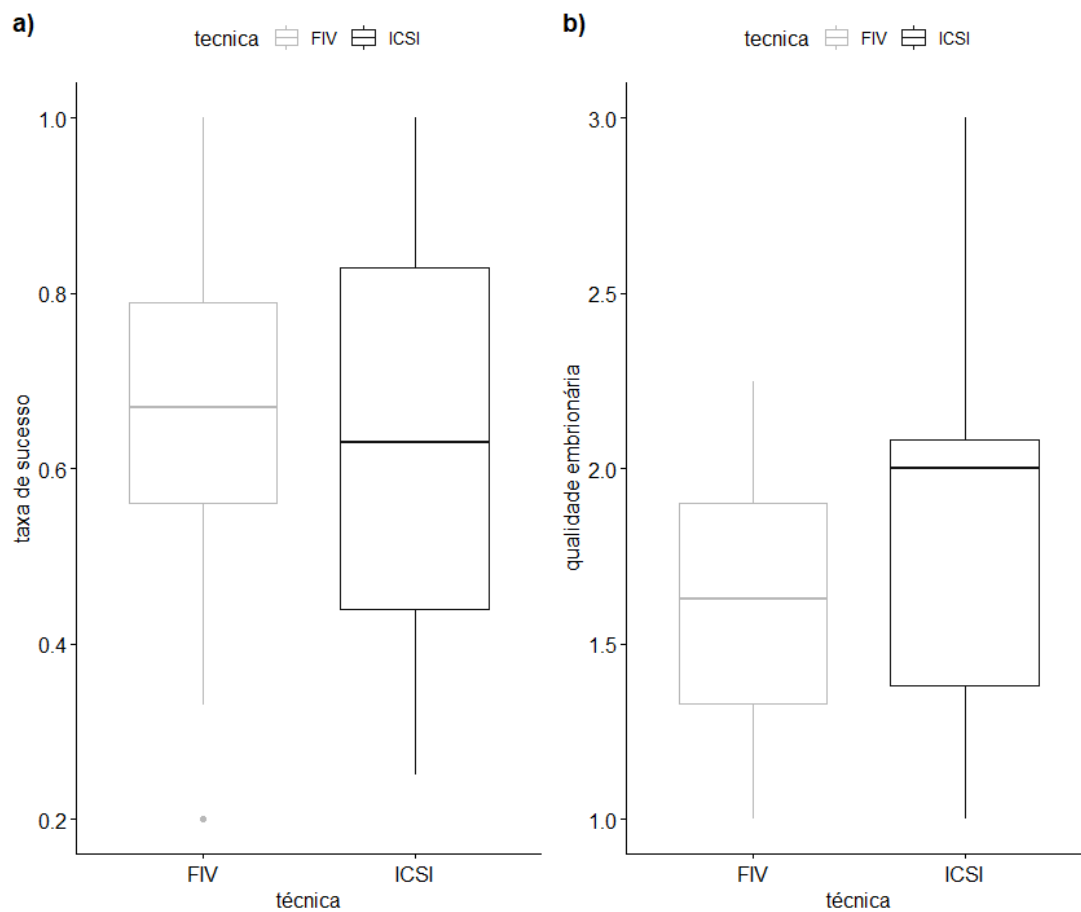


Figura 2. Diagramas de caixa representando as diferenças entre técnicas de inseminação para: a) taxa de sucesso de fecundação ovocitária; b) qualidade embrionária ao 3º. A FIV está representada a cinzento e ICSI a preto. As caixas representam os valores concentrados entre 25 e 75% da amostra e as linhas representam barras de erro.

3.2. Resultados dos modelos

3.2.1. Morfologia espermática

O melhor modelo para prever a qualidade morfológica espermática dos indivíduos masculinos amostrados, selecionado através do método iterativo tendo por base os valores de AIC foi o seguinte:

$$\text{morfologia espermática} \sim \text{tabaco} + \text{café} + \text{álcool} + \text{IMC} + \text{idade} + \text{tabaco:café} + \text{café:álcool} + \text{IMC:idade}$$

Ou seja, o efeito aditivo de todas as variáveis, juntamente com a interação entre os efeitos de tabaco e café, café e álcool, assim como IMC e idade explicam a maior variabilidade possível entre todas as combinações possíveis das variáveis explicativas

consideradas (**Tabela 6**). No entanto, nem todas as variáveis e interações mencionadas foram significativas. A análise dos efeitos principais para este modelo revela que o efeito do álcool isolado ($\chi^2 = 8.15$; $p < 0.05$), a interação do café e tabaco ($\chi^2 = 13.67$; $p < 0.01$) e do café com o álcool ($\chi^2 = 9.23$; $p < 0.05$) são os únicos significativos, com uma ligeira tendência verificada para a idade ($\chi^2 = 3.25$; $p = 0.071$; **Tabela 6**). Adicionalmente, as estimativas β de cada parâmetro demonstram que nenhum dos níveis de cada fator, assim como as suas interações, são significativamente distintos (**Tabela s1**). Isto dever-se-á, muito provavelmente, a uma amostra masculina reduzida que leva a erros padrão muito elevados para as estimativas β , resultando assim em intervalos de confiança demasiado amplos.

Tabela 6. Análise dos componentes principais para prever a variação da qualidade morfológica espermática nos indivíduos amostrados. São apresentados: a estatística de contraste associada a uma distribuição de χ^2 e graus de liberdade (gl) para cada parâmetro, assim como o *p-value* correspondente. Os símbolos “*” e “.” Representam significância ou proximidade de significância, respetivamente.

	χ^2	gl	<i>p-value</i>
tabaco	0.012	2	0.99
café	1.04	2	0.60
álcool	8.15	2	0.017 *
IMC	1.71	1	0.19
idade	3.25	1	0.071 .
tabaco: café	13.67	2	0.001 *
café: álcool	9.23	3	0.026 *
IMC: idade	2.58	1	0.11

De forma a comparar e verificar o ajuste deste modelo relativamente aos outros, efetuou-se, para além dos diagnósticos com as funções *vif* e *plot*, uma análise de desvio tendo em conta o modelo nulo, o *full model* e o modelo aqui selecionado. O desvio residual apresentado pelo modelo nulo é de 40.5. Já no modelo selecionado esta é significativamente mais baixa: 13.8 com 15 graus de liberdade (gl) utilizados ($p < 0.05$). Por sua vez, este é semelhante ao *full model*: 13.8 com 18 gl ($p = 1.00$). Assim, pelo princípio da parcimónia, confirma-se o modelo selecionado como o mais adequado para prever a qualidade morfológica espermática amostrada.

Os efeitos previstos pelo modelo podem ser visualizados na **Figura 3**. Verifica-se um efeito positivo na qualidade espermática dos níveis superiores do café para os níveis 1 e 3 do tabaco e nível 3 do álcool (**Figura 3.a e 3.b**), que serão provavelmente responsáveis pelo efeito geral positivo do álcool no nível 3 (**Figura 3.c**). Verifica-se também um efeito positivo da idade na morfologia espermática (**Figura 3.d**). Importa ainda mencionar que, apesar das diferenças apresentadas, os intervalos de confiança nas alíneas **a)** a **c)** são demasiado amplos para se inferir diferenças entre os níveis de consumo com elevado nível de confiança.

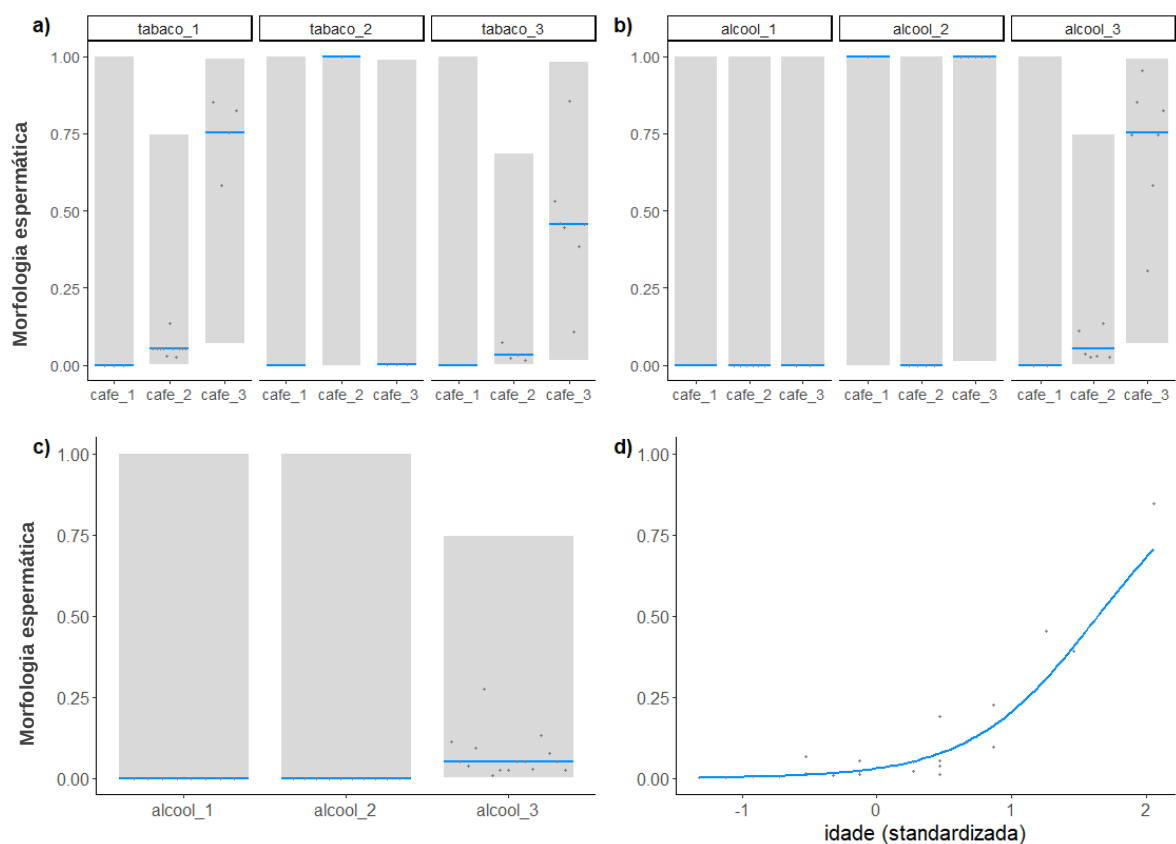


Figura 3. Efeitos significativos previstos pelo modelo selecionado representados por diagramas de caixas de a) a c) e por uma curva de regressão para d). Está representada a relação entre a morfologia espermática e: a) interação do consumo de tabaco com o de álcool; b) interação do consumo de álcool com o café; c) consumo de álcool apenas; e d) a idade estandardizada para a amostra. As caixas representam intervalos de confiança a 95% e a linha azul o valor médio.

3.2.2. Taxa de sucesso da fecundação

Relativamente à taxa de sucesso da fecundação, obteve-se o seguinte modelo de regressão mínima dos quadrados, pelos critérios de seleção aplicados:

$$\text{taxa de sucesso da fecundação} \sim \text{tabaco} + \text{café} + \text{tabaco:café}$$

Neste caso, apenas as variáveis que contemplam consumo de café e tabaco foram selecionadas, assim como a interação entre estas, representando assim os fatores de maior impacto entre todas as combinações possíveis das variáveis explicativas consideradas. Visto não se tratar de uma variável de resposta binomial, é possível aplicar a análise de variância (Anova) aos efeitos principais para este modelo. Esta revelou que os efeitos selecionados apenas se aproximam da significância na sua interação ($SQ = 0.25$; $p = 0.067$; **Tabela 7**). Adicionalmente, as estimativas β de cada parâmetro demonstram a interação entre o 2º nível de intensidade de consumo de tabaco e café, que interagem aumentando significativamente a taxa de sucesso da fecundação ($\beta = 0.48$; $p < 0.05$), relativamente aos dois primeiros níveis de cada uma destas variáveis (**Tabela s2**). De notar uma vez mais que a falta de dados leva a intervalos de confiança amplos na maior parte das situações, dificultando a interpretação destes resultados, inclusive levando à ausência de estimativas para alguns dos níveis em interação.

Tabela 7. Análise de variância dos componentes principais para prever a variação da taxa de sucesso da fecundação nos indivíduos amostrados. São apresentados: a soma dos quadrados, a estatística de contraste associada a uma distribuição de F (Fischer) e graus de liberdade (gl) para cada parâmetro, assim como o p -value correspondente. Os símbolos “*” e “.” Representam significância ou proximidade de significância, respetivamente.

	SQ	gl	F	p-value
tabaco	0.099	2	1.17	0.32
café	0.076	2	0.90	0.42
tabaco: café	0.25	2	2.92	0.067
residuais	1.57	37		

O ajuste deste modelo relativamente ao *full model* e ao modelo nulo, efetuou-se novamente recorrendo a diagnósticos com as funções *vif* e *plot*, e aplicando uma Anova tendo em conta os três modelos mencionados. A soma dos quadrados residuais apresentada pelo modelo nulo é de 1.95. Já no modelo selecionado esta é substancialmente mais baixa: 1.57. No entanto, não foi considerada significativa, dado os 6 gl adicionados por este modelo ($p = 0.33$). Por sua vez, este foi semelhante ao *full model*: 1.47 apesar deste adicionar 9 gl ao modelo selecionado ($p = 0.99$). Desta forma, o modelo selecionado não pode ser considerado como o mais adequado para

prever a taxa de sucesso da fecundação utilizando o princípio da parcimónia, ainda que este modelo explique bastante mais variância associada à variável de resposta que o modelo nulo.

Os efeitos previstos pelo modelo podem ser visualizados na **Figura 4**, onde se verifica um efeito geral positivo na taxa de sucesso da fecundação para o nível intermédio de consumo do tabaco relativamente aos outros níveis, ainda que este efeito não seja significativo por si só (**Figura 4.a**). A interação entre o tabaco e café, apesar dos intervalos de confiança amplos, consegue ainda assim demonstrar um efeito claramente positivo quando se contempla, dentro do nível intermédio de consumo de tabaco, o consumo intermédio de café, relativamente aos restantes níveis (**Figura 4.b**).

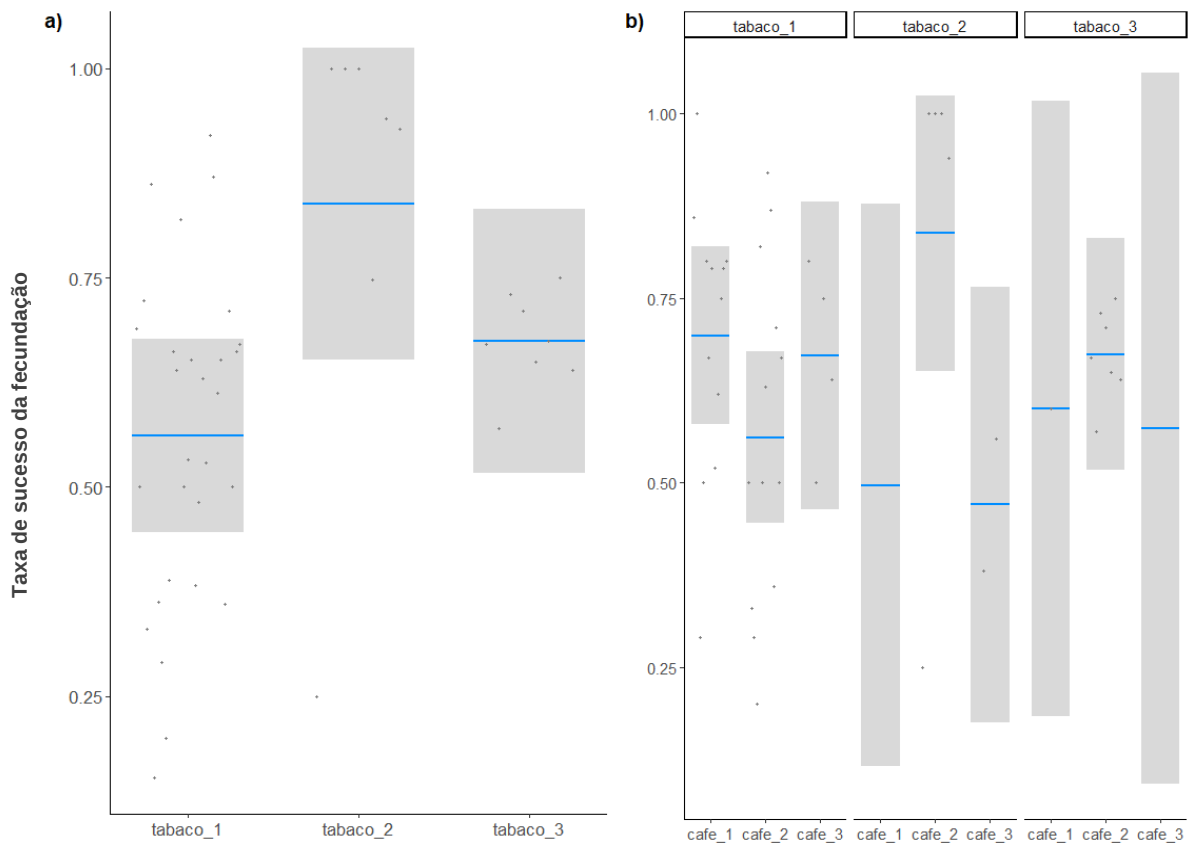


Figura 4. Efeitos previstos pelo modelo selecionado representados por diagramas de caixas. Está representada a relação entre a taxa de sucesso da fecundação e: a) consumo de tabaco; e b) interação do consumo de tabaco com o café. As caixas representam intervalos de confiança a 95% e a linha azul o valor médio.

3.2.3. Qualidade embrionária ao 3º e 5º dia do desenvolvimento

Finalmente, foram considerados indivíduos de ambos os sexos para identificar as variáveis que influenciam a qualidade embrionária ao terceiro e quinto dia. Relativamente ao terceiro dia, o seguinte modelo de regressão mínima dos quadrados foi selecionado:

$$\begin{aligned} \text{qualidade dia 3} \sim & \text{tabaco} + \text{café} + \text{álcool} + \text{idade} + \text{tabaco:café} + \text{tabaco:álcool} \\ & + \text{café:álcool} + \text{tabaco:café:álcool} \end{aligned}$$

Apenas o efeito principal da variável IMC está ausente, verificando-se o efeito aditivo da idade a atuar em conjunto com todas as dimensões de interações entre as três variáveis de hábitos de consumo para prever a qualidade de embriões ao terceiro dia. A Anova revela um efeito significativo da variável idade ($SQ = 5.51$; $p < 0.05$) e do consumo de álcool ($SQ = 13.78$; $p < 0.001$), assim como uma forte tendência da interação de três vias entre o consumo de tabaco, café e álcool ($SQ = 4.6$; $p = 0.062$; **Tabela 8**).

As estimativas β associadas aos coeficientes de cada nível de variável revelam uma forte influência positiva do segundo nível de intensidade de consumo de álcool em relação ao 1º ($\beta = 1.13$; $p = 0.058$). Além disso, também se revelaram significativas as variáveis seguintes: idade ($\beta = 0.30$; $p < 0.05$); interação de três vias entre o nível mais intenso de consumo de tabaco e os níveis intermédios de café e álcool, relativamente aos menores níveis desta interação ($\beta = -3.61$; $p < 0.05$; **Tabela s3**).

Tabela 8. Análise de variância dos componentes principais para prever a qualidade embrionária ao 3º dia resultante dos indivíduos amostrados. São apresentados: a soma dos quadrados (SQ), a estatística de contraste associada a uma distribuição de *F* (*Fischer*) e graus de liberdade (gl) para cada parâmetro, assim como o *p-value* correspondente. Os símbolos “*” e “.” Representam significância ou proximidade de significância, respetivamente.

	SQ	gl	<i>F</i>	<i>p-value</i>
tabaco	3.51	2	2.37	0.10
café	2.89	2	1.96	0.15
álcool	15.42	2	10.43	0.00016 *
idade	5.20	1	7.03	0.011 *
tabaco: café	2.61	3	1.18	0.33
tabaco: álcool	1.55	4	0.52	0.72
café: álcool	1.35	4	0.46	0.77
tabaco: café:	4.35			
 álcool		2	2.94	0.062 .
residuais	36.97	50		

Os diagnósticos ao modelo revelaram bom ajuste. Da mesma forma, a análise de variância mostrou que o modelo selecionado é significativamente mais adequado que o modelo nulo ou o *full model*. Especificamente, a soma dos quadrados residuais apresentada pelo modelo nulo é de 70 comparativamente a 36.97 com 20 gl adicionais no modelo selecionado ($p < 0.05$). Por sua vez, este valor é semelhante ao *full model* (36.20), com 2 gl adicionados ao modelo selecionado ($p = 0.60$).

A **Figura 5** permite visualizar os efeitos significativos. Nomeadamente, pode-se verificar o aumento da qualidade embrionária para o nível intermédio de consumo de álcool relativamente aos restantes (**Figura 5.a**), e uma tendência ascendente da qualidade embrionária com o avanço da idade (**Figura 5.b**). Por sua vez, nas **figuras 5.c1** e **5.c2** é possível visualizar a interação de três vias entre os hábitos de consumo. Utilizou-se o primeiro e terceiro nível de consumo de tabaco para poder constatar as diferenças significativas observadas na **tabela s3**, que se referem ao aumento de qualidade embrionária que se dá entre os primeiros níveis das três variáveis (tabaco 1, café 1 e álcool 1) relativamente aos níveis intermédios de consumo de café e álcool dentro do terceiro nível de tabaco (tabaco 3, café 2 e álcool 2). Adicionalmente, parece verificar-se uma tendência de decréscimo na qualidade embrionária para os níveis mais elevados de consumo de café enquanto

interagem com o segundo e terceiro nível de consumo de álcool, dentro do último nível de tabaco (tabaco 3, café 3 e álcool 2 e 3).

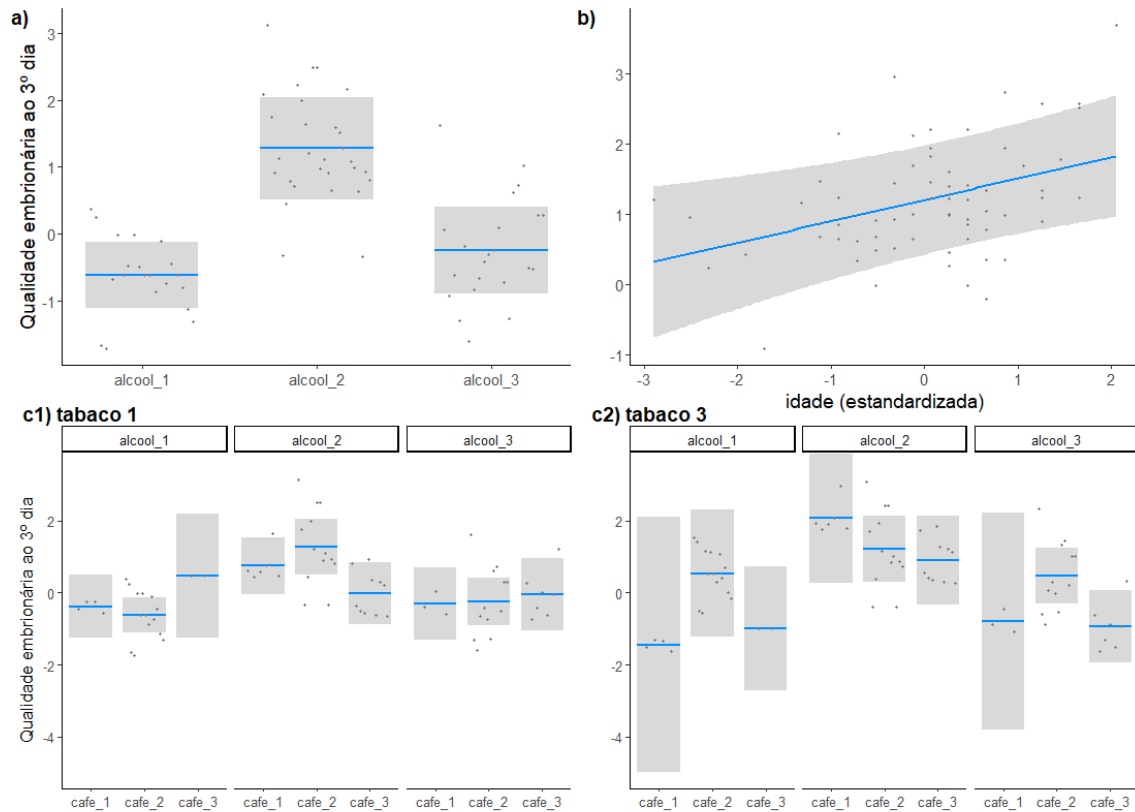


Figura 5. Efeitos previstos pelo melhor modelo selecionado representados por diagramas de caixas ou linha de regressão. Está representada a relação entre a qualidade embrionária ao 3º dia e: a) consumo de álcool; b) idade (estandardizada); e c) a interação de três vias entre o tabaco, café e álcool, representado pela interação entre consumo de café e álcool para o menor (c1) e maior (c2) nível de consumo de tabaco, visto ser a diferença de níveis em que se obteve significância (**Tabela s3**). As caixas representam intervalos de confiança a 95% e a linha azul o valor médio.

Já ao quinto dia, foi selecionado o seguinte modelo:

$$qualidade \text{ dia } 5 \sim tabaco + álcool + IMC + idade$$

Obtém-se assim um modelo sem interações, contendo apenas efeitos aditivos de dois hábitos de consumo assim como IMC e idade ($SQ_{tabaco} = 5.11$; $SQ_{álcool} = 5.91$; $SQ_{IMC} = 3.81$; $SQ_{idade} = 6.65$; $p < 0.05$). Neste caso, todos os efeitos principais mostraram-se significativos segundo a Anova aplicada (**Tabela 8**). O que, em conjunto com os diagnósticos efetuados, parece indicar que se trata de um modelo cujas variáveis explicativas são definitivamente importantes na previsão da qualidade embrionária ao quinto dia. Adicionalmente, tanto o consumo intermédio de álcool, como de tabaco têm

efeitos significativamente distintos na qualidade embrionária (**Tabela s4**). Nomeadamente, há um decréscimo significativo na qualidade embrionária do primeiro para o segundo nível de consumo de tabaco ($\beta = -0.96$; $p < 0.05$). Contrariamente, a qualidade aumenta significativamente do primeiro para o segundo nível de álcool ($\beta = 0.91$; $p < 0.01$). No entanto, em ambos os casos, a qualidade embrionária retorna no terceiro nível de cada fator a um valor semelhante (ainda que ligeiramente superior) ao que se verifica no primeiro nível. Esta relação pode ser visualizada na **Figura 6** (alíneas **a** e **b**), onde está ainda representado o aumento da qualidade embrionária ao 5º dia (**Figura 6.a**) e, em contraste, a sua relação inversa com o IMC (**Figura 6.b**).

Tabela 9. Análise de variância dos componentes principais para prever a qualidade embrionária ao 5º dia resultante dos indivíduos amostrados. São apresentados: a soma dos quadrados, a estatística de contraste associada a uma distribuição de *F* (*Fischer*) e graus de liberdade (gl) para cada parâmetro, assim como o *p-value* correspondente. Os símbolos “*” e “.” Representam significância ou proximidade de significância, respetivamente.

	SQ	gl	F	p-value
tabaco	5.11	2	3.41	0.042 *
álcool	5.91	2	3.95	0.026 *
IMC	3.81	1	5.08	0.029 *
idade	6.65	1	8.89	0.0047 *
residuais	32.93	44		

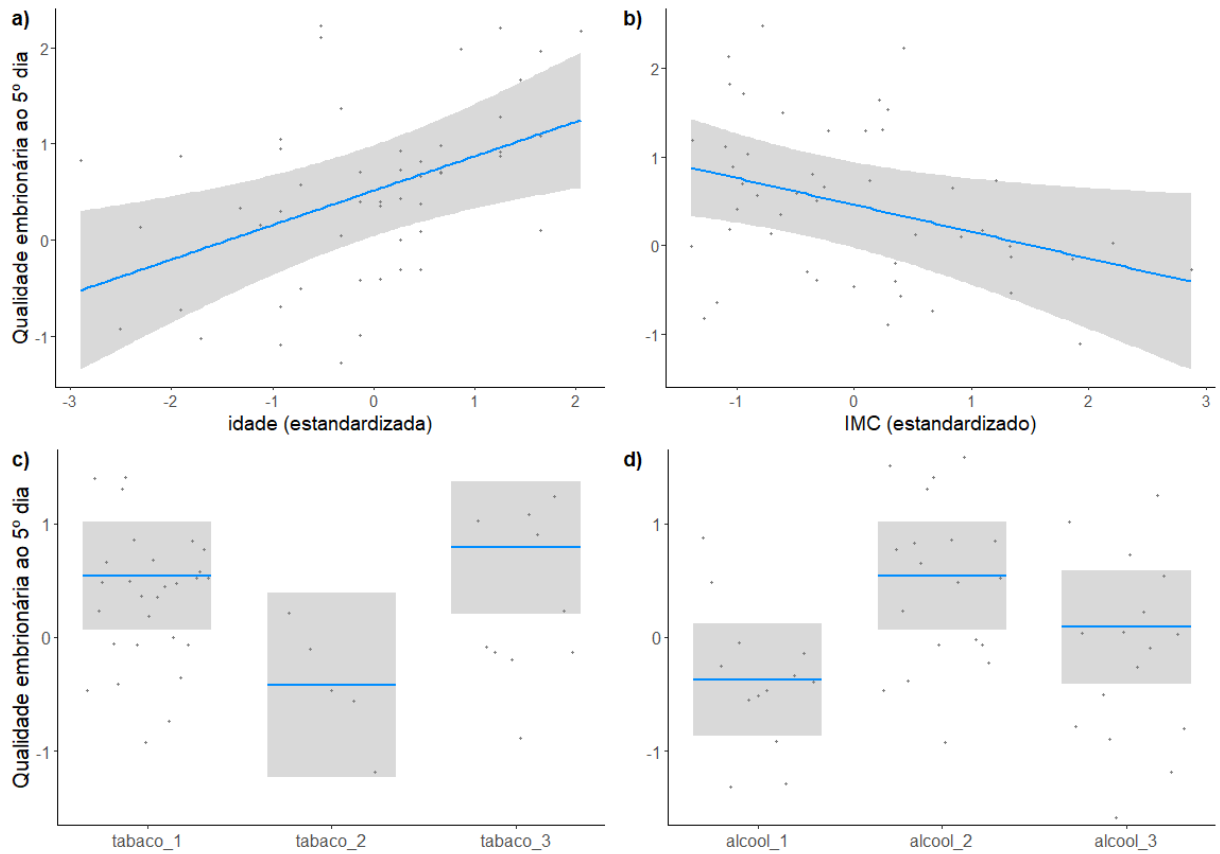


Figura 6. Efeitos previstos pelo melhor modelo selecionado representados por linhas de regressão ou diagramas de caixa. Está representada a relação entre a qualidade embrionária ao 5º dia e: a) idade (estandardizada); b) IMC (estandardizado); c) consumo de tabaco; e d) consumo de álcool. As caixas representam intervalos de confiança a 95% e a linha azul o valor médio.

4. Discussão dos resultados

4.1. Resultados descritivos da amostra

4.1.1. Hábitos de consumo entre sexos

No geral, os hábitos de consumo foram superiores no homem em relação à mulher, sendo este resultado significativo para o café e o álcool. Estes resultados são consistentes com a bibliografia disponível. A generalidade dos estudos que comparam a ingestão de álcool em diferentes sociedades e culturas concluem que os homens excedem as mulheres a nível de consumo, embora os tamanhos dessas diferenças de género variem muito de um contexto social para outro (Wilsnack *et al.*, 2000; Holmila & Raitasalo, 2005). Também é comumente aceite que há mais homens fumadores do que mulheres (Jha *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2007). No entanto, em muitos países desenvolvidos, a proporção de mulheres fumadoras tem se aproximado da proporção de homens fumadores, devido sobretudo a um decréscimo acentuado no consumo de tabaco pelos últimos (WHO, 2005), o que justifica não ter sido observadas diferenças significativas entre os dois sexos para este hábito de consumo.

4.1.2. Sucesso da fecundação e qualidade embrionária para as diferentes técnicas

Por norma, iniciado um tratamento de PMA, a decisão relativamente à técnica a ser utilizada é feita após a avaliação do quadro do casal. Diagnosticado um fator grave de infertilidade masculina ou havendo um histórico de falhas prévias de ciclos de FIV, a técnica a realizar será a ICSI. Existem outras situações em que a escolha da ICSI é fundamental para o sucesso do tratamento (e. g. ciclos com ovócitos congelados ou realização de diagnóstico genético pré-implantação) (Thornhill *et al.*, 2005; Gook & Edgar, 2007). Contudo, esta técnica tem sido também cada vez mais utilizada em casos de infertilidade idiopática, idade materna avançada, baixa qualidade ovocitária ou número reduzido de ovócitos disponíveis, com o objetivo de diminuir as falhas de fecundação (*Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine*, 2012).

Assim, nos últimos anos, a ICSI tornou-se a técnica preferencial em laboratório, mesmo para fatores moderados de infertilidade masculina ou até em casos diagnosticados como normais, sendo por isso rotineiramente mais utilizada do que

uma FIV convencional (De Geyter *et al.*, 2018). Porém, nem todos os estudos estão de acordo com a utilização preferencial da ICSI, já que esta é mais demorada, dispendiosa e invasiva, além de ainda persistirem algumas questões em relação a um possível risco inerente à técnica na descendência (Wong & Ledger, 2013).

No caso deste trabalho, as diferenças entre FIV e ICSI, em termos de taxa de sucesso da fecundação e qualidade embrionária, não foram significativas. Verificou-se apenas uma taxa de fecundação ligeiramente superior na FIV que nos ciclos de ICSI e o oposto no que diz respeito à qualidade embrionária.

A falta de significância entre as duas técnicas para a qualidade embrionária é consistente com os resultados de vários outros trabalhos (Bukulmez *et al.*, 2000; Fishel *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2008; Yoeli *et al.*, 2008). Estes resultados estão também de acordo com os obtidos por um estudo de 2017, que avaliou as diferenças nas taxas de fecundação e de nados-vivos entre ICSI e FIV convencional em ciclos sem fator de infertilidade masculino e com idade materna avançada (Tannus *et al.*, 2017). Da mesma forma, no estudo desenvolvido por Bhattacharya *et al.* (2001), os resultados falharam em mostrar benefícios clínicos do uso da ICSI em casos onde se poderia recorrer à FIV convencional, quer na taxa de fecundação, quer na taxa de implantação. Outros autores também não identificaram diferenças significativas entre as técnicas no que diz respeito à taxa de fecundação (Gozlan *et al.*, 2007; Borini *et al.*, 2009), nem encontraram benefícios na ICSI em relação à FIV convencional (Drakopoulos *et al.*, 2019). No entanto, e apesar de não ser diretamente comparável, a taxa de gravidez levada à termo foi significativamente superior recorrendo à FIV convencional num dos trabalhos (Check *et al.*, 2011). Já nos estudos de Taylor *et al.* (2008) e Li *et al.* (2018) as taxas de fecundação foram maiores na FIV convencional que na ICSI. Por outro lado, segundo Khamsi *et al.* (2001), o recurso à ICSI em ciclos sem fator de infertilidade masculino aumenta a taxa de fecundação e a qualidade dos embriões resultantes, observando-se resultados semelhantes noutros estudos disponíveis (Fishel *et al.*, 2000; Rosen *et al.*, 2010).

De facto, a ICSI é uma técnica eficaz em casos de fator de infertilidade masculino e pode aumentar as taxas de sucesso quando anteriormente ocorreram falhas de fecundação por FIV convencional. A sua utilização independentemente da causa da infertilidade surge do pressuposto de que a ICSI está associada a uma menor probabilidade de falha de fecundação e a um potencial aumento do número de embriões (Tucker *et al.*, 2001; Abu-Hassan & Al-Hasani, 2003). Apesar disso, baseado na evidência disponível, que é corroborada por este estudo, a sua utilização como

rotina não parece ser justificada e deve ser considerada com certa cautela. A FIV é comparativamente menos exigente em termos de experiência técnica, equipamentos especializados e tempo dispensado. Por esse motivo, identificada a causa da infertilidade, a determinação do tratamento deve ter em conta todas as técnicas disponíveis, a sua eficácia para o caso e também o custo-benefício para o casal, permanecendo na primeira linha de resposta aquelas que de entre todas possam promover a gravidez através dum processo mais simples em termos de rotina.

4.2. Resultados dos modelos

4.2.1. Morfologia espermática

Verificou-se que a morfologia espermática é influenciada por todos os hábitos de consumo de alguma forma. Nomeadamente, no consumo em conjunto de tabaco ou álcool com café as diferenças observadas na qualidade espermática foram significativas. O que se observou foi um aumento de qualidade com o aumento de consumo de café nos indivíduos que consomem menos e mais tabaco e nos indivíduos que consomem mais álcool. Também se observou um aumento da qualidade espermática nos indivíduos que consomem mais álcool.

Estes resultados não correspondem aos esperados. Uma meta-análise de 2011 conclui que a idade avançada masculina, o tabagismo, consumo de álcool e stress psicológico são fatores de risco para a qualidade seminal (Li *et al.*, 2011). Os resultados de outra meta-análise recente mostrou que a ingestão de álcool tem um efeito negativo no volume e morfologia espermática, sendo que a diferença foi mais acentuada no grupo consumidores ocasionais *versus* consumidores diários, do que no grupo nunca *versus* consumidores ocasionais, sugerindo que um consumo ocasional não afeta adversamente os parâmetros seminais (Ricci *et al.*, 2017). Diferentemente, outro estudo de 2017 falhou em encontrar associação entre o consumo de álcool e cafeína e a qualidade seminal.

De facto, o que se observa na bibliografia é que continua a não existir um consenso em relação aos efeitos isolados do álcool, tabaco e cafeína na fertilidade masculina (Goverde *et al.*, 1995; Donnelly *et al.*, 1999; Künzle *et al.*, 2003; Muthusami & Chinnaswamy, 2005; Jensen *et al.*, 2016). Essa discordância entre estudos pode se dever a tamanhos amostrais pequenos considerados, a diferenças nas populações de pacientes estudadas, a fatores ambientais dos diferentes locais onde os estudos foram

conduzidos e a falta de controlo sobre variáveis de confusão (Martini *et al.*, 2004; Ramlau-Hansen *et al.*, 2007; Soares & Melo, 2008).

Por outro lado, a maioria dos investigadores não separa na análise estatística os indivíduos que têm mais do que um hábito de consumo, daqueles que possuem apenas um. Além disso, são escassos os estudos que avaliam a interação entre os hábitos de consumo, sendo que nos poucos disponíveis o foco tem sido no efeito combinado do álcool e tabaco nos parâmetros espermáticos (Martini *et al.*, 2004; Anifandis *et al.*, 2014; de Jong *et al.*, 2014), sem entrar em linha de conta com a cafeína. Por esse motivo os possíveis efeitos sinérgicos ou aditivos dessas substâncias na fisiologia reprodutiva masculina não podem ser descartados.

Nesta análise da morfologia espermática, a baixa quantidade de amostras e inquéritos preenchidos conduz a intervalos de confiança demasiado amplos (**Figura 3**) para analisar devidamente as interações entre os diferentes níveis dos hábitos para os quais se obteve valores significativos. Tal faz com que a interpretação destes resultados deva ser feita com cautela, provavelmente restringindo a análise mais aos efeitos principais das variáveis significativas que demonstraram ser importantes fatores que interagem entre si para influenciar a morfologia espermática.

4.2.2. Taxa de sucesso da fecundação

Dum ponto de vista biológico, o ovócito é amplamente responsável pela regulação de eventos envolvidos na fecundação. Para que a fecundação ocorra, o ovócito tem que passar por uma série de processos complexos de maturação nuclear e citoplasmática (Swain & Pool, 2008). No entanto, anomalias na ocorrência normal desses processos nem sempre se refletem no aspeto morfológico do ovócito (Rosen *et al.*, 2010). Por outro lado, a avaliação da maturidade e qualidade dos ovócitos através dum sistema de *score* morfológico é um processo difícil, já que os mecanismos subjacentes ao aspeto ovocitário são complexos e as alterações identificadas por vezes não são sinónimo de inviabilidade (Balaban & Urman, 2006). Além disso, avaliações da morfologia ovocitária só são realizadas em ciclos de ICSI, onde a desnudação das células do *cumulus* permite que se faça um exame morfológico das características citoplasmáticas e nucleares. Por esses motivos, neste trabalho, a qualidade ovocitária não foi diretamente avaliada através da morfologia, mas encontra-se incluída na taxa de sucesso da fecundação, já que esta é determinada tendo em conta o número de ovócitos puncionados/maturos que fecundaram. A taxa de fecundação como marcador substituto para a qualidade dos ovócitos foi, portanto, utilizada, partindo do princípio

que ovócitos imaturos ou de qualidade inferior levariam a taxas mais baixas de fecundação.

Para a taxa de sucesso da fecundação, o modelo que se verificou como o melhor foi um modelo mais simples, onde apenas a interação entre o tabaco e o café aparentam ter um efeito substancial na taxa de sucesso. Efetivamente, parece existir um pico significativo na taxa de sucesso relativamente a valores intermédios de consumo de tabaco e café, sendo esta taxa inferior em todos os restantes valores (**Figura 4.b**). Visto os consumos intermédios refletirem hábitos ocasionais, esporádicos ou sociais, esta subida aparentemente inesperada poderá estar relacionada com outros aspetos não abrangidos por este estudo, como fatores psicossociais (Smeenk *et al.*, 2001; Cesta *et al.*, 2016), hábitos alimentares (Jahangirifar *et al.*, 2019) e prática de exercício físico (Kucuk *et al.*, 2010). No entanto, uma vez mais o número reduzido de dados leva a intervalos de confiança bastante amplos e por isso a interpretação deve ser feita com cautela. Adicionalmente, o facto do modelo não ser significativamente mais bem ajustado que o modelo nulo e de restar muita variância por explicar neste modelo (**Tabela s2**), demonstra que não é um modelo extremamente robusto e que deverão existir outros fatores não considerados que poderão ser ainda mais determinantes na previsão da taxa de sucesso da fecundação.

4.2.3. Qualidade embrionária ao 3º e 5º dia do desenvolvimento

Após a fecundação, o zigoto precisa de passar por uma sequência altamente organizada de eventos. A ocorrência desses fenómenos está dependente duma reorganização dos genomas parentais, bem como de mudanças epigenéticas que orientam a diferenciação celular e restantes processos celulares (Chason *et al.*, 2011). Contudo, na bibliografia, são praticamente inexistentes os estudos que consideram o impacto conjunto de ambos os membros do casal na qualidade embrionária (Finger *et al.*, 2015; McPherson *et al.*, 2015).

No caso deste estudo, no entanto, a avaliação do efeito dos hábitos de consumo no desenvolvimento pós-fecundação considerou a combinação da componente feminina e masculina nas duas variáveis indiciadoras do desenvolvimento embrionário escolhidas: a qualidade embrionária ao 3º e ao 5º dia. Para esta análise, como o número de amostras foi mais elevado, obteve-se no geral modelos mais informativos, o que permitiu analisar as estimativas obtidas com maior precisão.

Ao 3º dia do desenvolvimento embrionário, verificou-se um efeito significativo do álcool para níveis intermédios de consumo e uma forte tendência de significância para a interação entre o tabaco, café e álcool (**Tabela 8; Figura 5**). No caso da interação, a tendência foi dum aumento na qualidade embrionária para indivíduos com consumo intermédio de álcool e café e um consumo mais elevado de tabaco, quando em comparação com os indivíduos com o menor consumo das três substâncias. Já no caso do álcool, a tendência manifestou-se de forma semelhante à interação: ocorreu um aumento da qualidade embrionária para níveis intermédios, relativamente aos outros dois níveis de consumo considerados (**Tabela s3**). Parece, portanto, verificar-se novamente um impacto positivo dos hábitos de consumo intermédios, que por sua vez tende a diminuir quando os consumos são maiores.

Em relação à qualidade embrionária ao 5º dia, foi possível observar um efeito conjunto significativo dos hábitos de consumo de café e álcool, assim como do IMC e da idade. Apenas estas quatro variáveis explicativas foram selecionadas pelo modelo e, por isso, o facto de serem todas significativas parece ser um forte indicativo da importância delas para a previsão da qualidade nesta fase do desenvolvimento do embrião.

No que diz respeito aos dois hábitos de consumo, estes revelaram efeitos opostos: o consumo intermédio de tabaco levou a valores mais baixos de qualidade embrionária, enquanto que o consumo intermédio de álcool conduziu novamente a valores maiores de qualidade. Este efeito inconsistente é curioso, contrariando o padrão visto até agora da subida de qualidade nos níveis intermédios no caso do tabaco. Tal pode ser reflexo das várias limitações que afetam o estudo, desde o preenchimento potencialmente pouco preciso dos questionários, à própria dificuldade em categorizar os hábitos de consumo em poucas classes. É possível ainda refletir as diferentes propriedades da substância considerada, visto que o impacto de consumir tabaco a um nível intermédio poderá diferir severamente daquilo que é considerado um consumo esporádico de bebidas alcoólicas ou cafés.

Já para as variáveis fisiológicas, a adição do efeito do IMC levou, com o seu aumento, a uma diminuição da qualidade embrionária. Este resultado corresponde ao esperado, dado ser reconhecido pela bibliografia que o excesso de peso afeta negativamente o sucesso dos ciclos de PMA (Moragianni *et al.*, 2012; Caillon *et al.*, 2015). É de notar que a variável IMC não apareceu no modelo da qualidade embrionária ao 3º dia, mas surgiu, embora não de forma significativa, no modelo selecionado para a morfologia dos espermatozoides. É possível que este resultado esteja relacionado com uma

maior influência da componente masculina no desenvolvimento embrionário ao 5º dia relativamente ao 3º, visto ser em geral aceite que o genoma paterno não está ativo na fase de clivagem e, portanto, a influência do IMC paterno até ao terceiro dia será mais limitada (Artley *et al.*, 1992). Por outro lado, nas fases posteriores do desenvolvimento embrionário e após a ativação do genoma embrionário, o impacto do IMC paterno poderá ser então maior. Tal como aconteceu neste estudo, outros investigadores também já obtiveram resultados semelhantes, não tendo identificado relação entre o IMC e o desenvolvimento embrionário até ao 3º dia (Merhi *et al.*, 2013), mas sim na fase de blastocisto, onde um IMC paterno maior esteve associado a alterações no desenvolvimento normal dos embriões de 5º dia (Bakos *et al.*, 2011).

Em relação à idade, esta também se revelou um fator importante para a qualidade embrionária ao 5º dia. Curiosamente, observou-se uma tendência significativa de melhoria da qualidade com o aumento da idade. Essa tendência também foi observada para a morfologia dos espermatozoides, embora nesse caso o efeito positivo da idade apenas se tenha aproximado da significância. Está bem estabelecido que a idade é um dos principais fatores limitantes da fertilidade e dos resultados das técnicas de PMA (Balasch, 2010; Balasch & Grataco, 2012). No entanto, alguns estudos, apesar de observarem alterações noutros parâmetros, não identificam um declínio na qualidade morfológica dos embriões com a idade. Tal é um indício de que possivelmente a classificação da qualidade embrionária pelo método de *score* morfológico não será o meio de avaliação mais informativo do efeito da idade nos embriões. Contudo, este aumento da qualidade embrionária com a idade poderá estar relacionado com a amostra em si. De facto, apenas 5 em 51 dos indivíduos utilizados para este modelo apresentam idade inferior a 30 anos, rondando a média de idades os 36.3 anos, o que resulta numa amostra um pouco envelhecida relativamente ao pico de fertilidade e com uma sub-representação do efeito de indivíduos mais jovens que poderiam elevar o impacto positivo das idades inferiores na qualidade embrionária.

No geral, apesar de uma amostra pequena que limitou a análise das interações entre efeitos, a influência dos hábitos de consumo na fertilidade foi consistentemente demonstrada e corroborada. O consumo de tabaco esteve presente em todos os modelos selecionados, afetando de forma significativa ou próximo de significância, sozinho ou em interação com outros hábitos, todos os indicadores de fertilidade analisados. Também o álcool e o café apareceram consistentemente, com destaque para o efeito do álcool que se revelou significativo em todos os modelos que apareceu,

não estando presente apenas no modelo de taxa de sucesso da fecundação, que foi o modelo com pior ajuste.

Este estudo apresenta, no entanto, algumas limitações. Como já foi dito, a principal limitação foi o baixo número de amostras, que restringiu grandemente a capacidade de ajuste dos modelos aplicados. Este número reduzido de amostras torna-se ainda mais limitante dado a abordagem do estudo que, embora mais realista, é mais complexa, pois procurar englobar os efeitos de forma sinérgica, em vez de se limitar a uma análise individual de cada efeito. Adicionalmente, a divisão em categorias de frequência de consumo representa também uma limitação que surge pela dificuldade em precisar quantidades relativas ao consumo de bebidas alcoólicas e cafeinadas.

Os resultados deste estudo demonstraram a importância de uma abordagem mais complexa que integre simultaneamente os diferentes hábitos de consumo do indivíduo e do casal, assim como os fatores fisiológicos para determinar o impacto destes na qualidade dos gametas e embriões resultantes. Futuramente, é importante expandir esta abordagem, trabalhando para se obter uma amostra mais representativa da população. É também importante procurar homogeneizar os critérios que reflitam as variáveis a ser analisadas para que os questionários possam ser standardizados e utilizados com maior abrangência, possibilitando que se estabeleça comparações mais diretas entre estudos. Além disso, outros métodos de classificação devem ser considerados, já que as avaliações por métodos puramente morfológicos podem não refletir corretamente o impacto de determinadas variáveis na qualidade dos gametas e embriões. E por fim, deve-se trabalhar em formas de obter e categorizar a informação relativa ao consumo de drogas recreativas ou medicação como antidepressivos e ansiolíticos, visto se tratar de fatores que, em conjunto com aqueles que se verificaram neste estudo, poderão ser determinantes para a fertilidade.

5. Conclusão

Os estilos de vida incluem comportamentos e hábitos modificáveis que podem influenciar bastante a saúde e o bem-estar geral, incluindo a fertilidade. Muitos destes comportamentos, como a idade em que se inicia a família, a nutrição, o peso, a prática de exercício físico, o stress, determinadas exposições ambientais e ocupacionais, assim como o consumo de tabaco, álcool e cafeína e o uso de drogas podem influenciar negativamente a fertilidade. Atualmente, o papel que os estilos de vida desempenham na fertilidade tem sido muito investigado. O presente estudo abrangeu os fatores idade, IMC e hábitos de consumo de álcool, tabaco e cafeína, com o intuito de avaliar os seus efeitos isolados e combinados na morfologia espermática, na taxa de sucesso da fecundação e na qualidade embrionária ao 3º e 5º dia de desenvolvimento.

Este foi um dos primeiros estudos a considerar simultaneamente várias componentes fundamentais para o êxito do ciclo de fertilização *in vitro*, concentrando-se não só nas consequências destes fatores mencionados na componente feminina e masculina separadamente, mas observando também a importância do casal.

Apesar do número pequeno de indivíduos e da aparente discrepância entre alguns dos resultados obtidos e a bibliografia, este estudo evidencia a importância de considerar o impacto simultâneo de vários hábitos de vida. É frequente que um mesmo paciente tenha como estilo de vida mais do que um dos comportamentos mencionados anteriormente e por isso uma abordagem integrativa torna-se fundamental. Para além disso, considerar o contexto do casal e não apenas o papel da mulher ou do homem em isolado durante o desenvolvimento embrionário é essencial, pois nesta fase a componente materna e paterna exercem um papel conjunto e, portanto, a inclusão confere mais robustez aos resultados.

Os estilos de vida discutidos no presente estudo revelaram ter o potencial para isoladamente ou em conjunto afetar significativamente a fertilidade. É importante continuar a desenvolver o conhecimento e as técnicas que permitam determinar com maior precisão de que forma os estilos de vida estão a influenciar a fertilidade e os resultados dos tratamentos, de modo a aconselhar os pacientes e, eventualmente, contribuir para a diminuição da incidência de infertilidade.

6. Bibliografia

Abu-Hassan, D., & Al-Hasani, S. (2003) 'The use of ICSI for all cases of in-vitro conception', *Human Reproduction*, 18(4), pp. 893–894. doi: 10.1093/humrep/deg132.

Adamson, G. D., de Mouzon, J., Chambers, G. M., Zegers-Hochschild, F., Mansour, R., Ishihara, O., Banker, M., & Dyer, S. (2018) 'International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2011', *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc., 110(6), pp. 1067–1080. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.06.039.

Aggerholm, A. S., Thulstrup, A. M., Toft, G., Ramlau-Hansen, C. H., & Bonde, J. P. (2008) 'Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile?', *Fertility and Sterility*, 90(3), pp. 619–626. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.07.1292.

Alper, M. M. (2012) 'Treatment options III. In vitro fertilization', in Bayer, S. R., Alper, M. M., & Penzias, A. S. (ed.) *The Boston IVF Handbook of Infertility: A practical guide for practitioners who care for infertile couples*. 3rd edn. London: Informa Healthcare, pp. 69–82.

Alvarez, S. (2015) 'Do some addictions interfere with fertility?', *Fertility and Sterility*. Elsevier Inc., 103(1), pp. 22–26. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.11.008.

Anifandis, G., Bounartzi, T., Messini, C. I., Dafopoulos, K., Sotiriou, S., & Messinis, I. E. (2014) 'The impact of cigarette smoking and alcohol consumption on sperm parameters and sperm DNA fragmentation (SDF) measured by Halosperm®', *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 290(4), pp. 777–782. doi: 10.1007/s00404-014-3281-x.

Ankum, W. M., Mol, B. W., Van der Veen, F., & Bossuyt, P. M. (1996) 'Risk factors for ectopic pregnancy: a meta-analysis', *Fertility and Sterility*. Elsevier Masson SAS, 65(6), pp. 1093–1099. doi: 10.1016/S0015-0282(16)58320-4.

Artley, J. K., Braude, P. R., & Johnson, M. H. (1992) 'Gene activity and cleavage arrest in human pre-embryos', *Human Reproduction*, 7(7), pp. 1014–1021. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137761.

Bahamondes, L., & Makuch, M. Y. (2014) 'Infertility care and the introduction of new reproductive technologies in poor resource settings', *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), p. 87. doi: 10.1186/1477-7827-12-87.

Bailey, M. J. (2006) 'More power to the pill: the impact of contraceptive freedom on women's life cycle labor supply', *The Quarterly Journal of Economics*, 121(1), pp. 289–320. doi: 10.1093/qje/121.1.289.

Bakos, H. W., Henshaw, R. C., Mitchell, M., & Lane, M. (2011) 'Paternal body mass index is associated with decreased blastocyst development and reduced live birth rates following assisted reproductive technology', *Fertility and Sterility*. Elsevier Ltd, 95(5), pp. 1700–1704. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.11.044.

Balaban, B., & Urman, B. (2006) 'Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation', *Reproductive BioMedicine Online*, 12(5), pp. 608–615. doi: 10.1016/S1472-6483(10)61187-X.

Balasch, J., & Grataco, E. (2012) 'Delayed childbearing: effects on fertility and the outcome of pregnancy', *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 24(3), pp. 187–193. doi: 10.1097/GCO.0b013e3283517908.

Balasch, J. (2010) 'Ageing and infertility: an overview', *Gynecological Endocrinology*, 26(12), pp. 855–860. doi: 10.3109/09513590.2010.501889.

Bath, L. E., Wallace, W. H. B., & Critchley, H. O. (2002) 'Late effects of the treatment of childhood cancer on the female reproductive system and the potential for fertility preservation', *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 109(2), pp. 107–114. doi: 10.1111/j.1471-0528.2002.t01-1-01007.x.

Bauer, T., Göhlmann, S., & Sinning, M. (2007) 'Gender differences in smoking behavior', *Health Economics*, 16(9), pp. 895–909. doi: 10.1002/hec.1259.

Bayer, S. R., & Alper, M. M. (2012) 'The Infertility Workup', in Bayer, S. R., Alper, M. M., & Penzias, A. S. (ed.) *The Boston IVF Handbook of Infertility*. 3rd edn. London: Informa Healthcare, pp. 19–34.

Bayer, S. R. (2012) 'Factors affecting fertility', in Bayer, S. R., Alper, M. M., & Penzias, A. S. (ed.) *The Boston IVF Handbook of Infertility: A practical guide for practitioners who care for infertile couples*. 3rd edn. London: Informa Healthcare, pp. 11–18.

Bellver, J., & Pellicer, A. (2004) 'Impact of obesity on spontaneous abortion', *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 190(1), pp. 293–294. doi: 10.1016/j.ajog.2003.08.007.

Benchabib, M., Lornage, J., Mazoyer, C., Lejeune, H., Salle, B., & Guerin, J. F. (2007) 'Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome', *Fertility and Sterility*, 87(1), pp. 93–100. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.05.057.

Best, L. (2015) 'Equipment required for time-lapse observations in in vitro fertilization', in Campbell, A., & Fishel, S. (ed.) *Atlas of Time Lapse Embryology*. New York: CRC Press, pp. 1–6.

Bhattacharya, S., Hamilton, M. P.R., Shaaban, M., Khalaf, Y., Seddler, M., Ghobara, T., Braude, P., Kennedy, R., Rutherford, A., Hartshorne, G., & Templeton, A. (2001) 'Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial', *The Lancet*, 357(9274), pp. 2075–2079. doi: 10.1016/S0140-6736(00)05179-5.

Boiso, I., Veiga, A., & Edwards, R. G. (2002) 'Fundamentals of human embryonic growth in vitro and the selection of high-quality embryos for transfer', *Reproductive BioMedicine Online*, 5(3), pp. 328–350. doi: 10.1016/S1472-6483(10)61841-X.

Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A., & Nygren, K. G. (2007b) 'International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care', *Human Reproduction*, 22(6), pp. 1506–1512.

Bolumar, F., Olsen, J., Rebagliato, M., & Bisanti, L. (1997) 'Caffeine intake and delayed conception: a European multicenter study on infertility and subfecundity', *American Journal of Epidemiology*, 145(4), pp. 324–334. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a010150.

Bongaarts, J. (1975) 'A method for the estimation of creatinine', *Demography*, 12(4), pp. 645–660. doi: 10.1042/bj0410586.

Borini, A., Gambardella, A., Bonu, M. A., Dal Prato, L., Sciajno, R., Bianchi, L., & Cattoli, M. (2009) 'Comparison of IVF and ICSI when only few oocytes are available for insemination', *Reproductive BioMedicine Online*, 19(2), pp. 270–275. doi: 10.1016/S1472-6483(10)60084-3.

Boyden, T. W., & Pamentor, R. W. (1983) 'Effects of Ethanol on the Male Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis', *Endocrine Reviews*, 4(4), pp. 389–396.

Bradley, K. A., Badrinath, S., Bush, K., Boyd-Wickizer, J., & Anawalt, B. (1998) 'Medical Risks for Women Who Drink Alcohol', *Journal of General Internal Medicine*, 13(9), pp. 627–639.

Braga, D. P. A. F., Halpern, G., Setti, A. S., Figueira, R. C. S., Iaconelli Jr, A., & Borges Jr, E. (2015) 'The impact of food intake and social habits on embryo quality and the likelihood of blastocyst formation', *Reproductive BioMedicine Online*, 31(1), pp. 30–38. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.03.007.

Brahem, S., Mehdi, M., Elghezal, H., & Saad, A. (2011) 'The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(5), pp. 425–432. doi: 10.1007/s10815-011-9537-5.

Breheny, P., & Burchett, W. (2019) 'R Package "visreg": Visualization of regression models using visreg, version 2.5-1.' Available at: <http://pbreheny.github.io/visreg>.

Broekmans, F. J., Knauff, E. A., te Velde, E. R., Macklon, N. S., & Fauser, B. C. (2007) 'Female reproductive ageing: current knowledge and future trends', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 18(2), pp. 58–65. doi: 10.1016/j.tem.2007.01.004.

Bromer, J. G., & Seli, E. (2008) 'Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics', *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 20(3), pp. 234–241.

Brugo-Olmedo, S., Chillik, C., & Kopelman, S. (2001) 'Definition and causes of infertility', *Reproductive BioMedicine Online*, 2(1), pp. 173–185. doi: 10.1016/S1472-6483(10)62193-1.

Bukulmez, O., Yarali, H., Yucel, A., Sari, T., & Gurgan, T. (2000) 'Intracytoplasmic sperm injection versus in vitro fertilization for patients with a tubal factor as their sole cause of infertility: a prospective, randomized trial', *Fertility and Sterility*, 73(1), pp. 38–42. doi: 10.1016/S0015-0282(99)00449-5.

Burnham, K. P., & Anderson, D. R. (2004) 'Multimodel inference: understanding AIC and BIC in model selection', *Sociological Methods and Research*, 33(2), pp. 261–304. doi: 10.1177/0049124104268644.

Caillon, H., Fréour, T., Bach-Ngohou, K., Colombel, A., Denis, M. G., Barrière, P., & Masson, D. (2015) 'Effects of female increased body mass index on in vitro fertilization cycles outcome', *Obesity Research and Clinical Practice*, 9(4), pp. 382–388. doi: 10.1016/j.orcp.2015.02.009.

Catalano, P. M. (2007) 'Management of obesity in pregnancy', *Obstetrics & gynecology*, 109(2), pp. 419–433.

Cesta, C. E., Viktorin, A., Olsson, H., Johansson, V., Sjölander, A., Bergh, C., Skalkidou, A., Nygren, K. G., Cnattingius, S., & Iliadou, A. (2016) 'Depression, anxiety, and antidepressant treatment in women: association with in vitro fertilization outcome', *Fertility and Sterility*, 105(6), pp. 1594-1602.e3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.01.036.

Chachamovich, J. R., Chachamovich, E., Ezer, H., Fleck, M. P., Knauth, D., & Passos, E. P. (2010) 'Investigating quality of life and health-related quality of life in infertility: a systematic review', *Journal of Psychosomatic Obstetrics & Gynecology*, 31(2), pp. 101–110. doi: 10.3109/0167482X.2010.481337.

Chamayou, S., Patrizio, P., Storaci, G., Tomaselli, V., Alecci, C., Ragolia, C., Crescenzo, C., & Guglielmino, A. (2013) 'The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(5), pp. 703–710. doi: 10.1007/s10815-013-9992-2.

Chason, R. J., Csokmay, J., Segars, J. H., DeCherney, A. H., & Armant, D. R. (2011) 'Environmental and epigenetic effects upon preimplantation embryo metabolism and development', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(10), pp. 412–420. doi: 10.1016/j.tem.2011.05.005.

Chavarro, J. E., Rich-Edwards, J. W., Rosner, B. A., & Willett, W. C. (2007) 'Diet and lifestyle in the prevention of ovulatory disorder infertility', *Obstetrics & Gynecology*, 110(5), pp. 1050–1058.

Chavarro, J. E., Rich-Edwards, J. W., Rosner, B. A., & Willett, W. C. (2009) 'Caffeinated and alcoholic beverage intake in relation to ovulatory disorder infertility', *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 20(3), pp. 374–381. doi: 10.1097/EDE.0b013e31819d68cc.

Chavarro, J. E., Toth, T. L., Wright, D. L., Meeker, J. D., & Hauser, R. (2010) 'Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic', *Fertility and Sterility*, 93(7), pp. 2222–2231.

Check, J. H., Yuan, W., Garberi-Levito, M. C., Swenson, K., & McMonagle, K. (2011) 'Effect of method of oocyte fertilization on fertilization, pregnancy and implantation rates in women with unexplained infertility', *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, 38(3), pp. 203–205.

Cicero, T. J., Meyer, E. R., & Bell, R. D. (1979) 'Effects of ethanol on the hypothalamic-pituitary-luteinizing hormone axis and testicular steroidogenesis', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 208(2), pp. 210–215.

Clementini, E., Palka, C., Iezzi, I., Stuppia, L., Guanciali-Franchi, P., & Tiboni, G. M. (2005) 'Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for Assisted Reproductive Techniques', *Human Reproduction*, 20(2), pp. 437–442. doi: 10.1093/humrep/deh626.

Conaghan, J., Chen, A. A., Willman, S. P., Ivani, K., Chenette, P. E., Boostanfar, R., Baker, V. L., Adamson, D., Abusief, M. E., Gvakharia, M., Loewke, K. E., & Shen, S. (2013) 'Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial', *Fertility and Sterility*, 100(2), pp. 412–419. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.021.

Cramer, D. W., Harlow, B. L., Xu, H., Fraer, C., & Barbieri, R. (1995) 'Cross-sectional and case-controlled analyses of the association between smoking and early menopause', *Maturitas*, 22(2), pp. 79–87.

Crosignani, P. G., Ragni, G., Parazzini, F., Wyssling, H., Lombroso, G., & Perotti, L. (1994) 'Anthropometric indicators and response to gonadotrophin for ovulation induction', *Human Reproduction*, 9(3), pp. 420–423.

Crosignani, P. G., Rubin, B., Acosta, A., Baird, D. T., Benagiano, G., Cohen, J., Collins, J., Cooke, I., Diczfalussy, E., Diedrich, K., Edwards, R. G., Farley, T., Filicon, M., Glasier, A., Hargreave, T., Jager, S., Mishell, D.R., Nieschlag, E., Ragni, G., L. (1996) 'Guidelines to the prevalence, diagnosis, treatment and management of infertility, 1996', *Human Reproduction*, 11(8), pp. 1775–1807. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019484.

Cruz, M., Gadea, B., Garrido, N., Pedersen, K. S., Martínez, M., Pérez-Cano, I., Muñoz, M., & Meseguer, M. (2011) 'Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(7), pp. 569–573. doi: 10.1007/s10815-011-9549-1.

Cummins, J. M., Breen, T. M., Harrison, K. L., Shaw, J. M., Wilson, L. M., & Hennessey, J. F. (1986) 'A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: Its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality', *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 3(5), pp. 284–295. doi: 10.1007/BF01133388.

Daar, A. S., & Merali, Z. (2002) 'Infertility and social suffering: the case of ART in developing countries', *Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction*, pp. 15-21.

Desai, N., Ploskonka, S., Goodman, L. R., Austin, C., Goldberg, J., & Falcone, T. (2014) 'Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles', *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), pp. 54–64.

Diamanti-Kandarakis, E., & Bergiele, A. (2001) 'The influence of obesity on hyperandrogenism and infertility in the female', *Obesity Reviews*, 2(4), pp. 231–238.

Donnelly, G. P., McClure, N., Kennedy, M. S., & Lewis, S. E. M. (1999) 'Direct effect of alcohol on the motility and morphology of human spermatozoa', *Andrologia*, 31(1), pp. 43–47.

Drakopoulos, P., Garcia-Velasco, J., Bosch, E., Blockeel, C., de Vos, M., Santos-Ribeiro, S., Makrigiannakis, A., Tournaye, H., & Polyzos, N. P. (2019) 'ICSI does not offer any benefit over conventional IVF across different ovarian response categories in

non-male factor infertility: a European multicenter analysis', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, pp. 1-10. doi: 10.1007/s10815-019-01563-1.

Dunphy, B. C., Barratt, C. L. R., & Cooke, I. D. (1991) 'Male alcohol consumption and fecundity in couples attending an infertility clinic', *Andrologia*, 23(3), pp. 219–221.

Faddy, M. J., & Gosden, R. G. (1996) 'A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women', *Human Reproduction*, 11(7), pp. 1484–1486.

Fejes, I., Koloszar, S., Zavaczki, Z., Daru, J., Szöllösi, J., & Pal, A. (2006) 'Effect of body weight on testosterone/estradiol ratio in oligozoospermic patients', *Archives of Andrology*, 52(2), pp. 97–102. doi: 10.1080/01485010500315479.

Fenster, L., Quale, C., Waller, K., Windham, G. C., Elkin, E. P., Benowitz, N., & Swan, S. H. (1999) 'Caffeine consumption and menstrual function', *American Journal of Epidemiology*, 149(6), pp. 550–557.

Ferraz, L. (2014) 'Avaliação do casal infértil - factor Masculino', in Barros, F., & Figueiredo, R. (ed.) *Manual de Medicina Sexual: visão multidisciplinar*. Lisbon: HSJ, Consultores, Lda, pp. 461–468.

Finger, B. J., Harvey, A. J., Green, M. P., & Gardner, D. K. (2015) 'Combined parental obesity negatively impacts preimplantation mouse embryo development, kinetics, morphology and metabolism', *Human Reproduction*, 30(9), pp. 2084–2096. doi: 10.1093/humrep/dev142.

Fisch, J. D., Rodriguez, H., Ross, R., Overby, G., & Sher, G. (2001) 'The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos', *Human Reproduction*, 16(9), pp. 1970–1975. doi: 10.1093/humrep/16.9.1970.

Fishel, S., Aslam, I., Lisi, F., Rinaldi, L., Timson, J., Jacobson, M., Green, S., Campbell, A., & Lisi, R. (2000) 'Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception?', *Human Reproduction*, 15(6), pp. 1278–1283. doi: 10.1093/humrep/15.6.1278.

Florack, E. I., Zielhuis, G. A., & Rolland, R. (1994) 'Cigarette smoking, alcohol consumption, and caffeine intake and fecundability', *Preventive Medicine*, 23(2), pp. 175–180.

Fox, J., Weisberg, S., Adler, D., Bates, D., Baud-Bovy, G., Ellison, S., Firth, D., Friendly, M., Gorjanc, G., Graves, S., Maechler, M., Monnet, G., Murdoch, D., Nilsson, H., Ogle, D., Ripley, B., Venables, W., Walker, S., Heiberger, R., Winsemius, D., & R.-C. (2012) 'R Package "car": An R Companion to Applied Regression, version 3.0-3.', *Vienna: R Foundation for Statistical Computing*. Available at: <https://cran.r-project.org/package=car>.

Gaur, D. S., Talekar, M. S., & Pathak, V. P. (2010) 'Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility', *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 53(1), pp. 35–40.

De Geyter, C., Calhaz-Jorge, C., Kupka, M. S., Wyns, C., Mocanu, E., Motrenko, T., Scaravelli, G., Smeenk, J., Vidakovic, S., & Goossens, V. (2018) 'ART in Europe, 2014: results generated from European registries by ESHRE', *Human Reproduction*, 33(9), pp. 1586–1601. doi: 10.1093/humrep/dey242.

Goldin, C. (2006) 'The quiet revolution that transformed women's employment, education, and family', *American Economic Review*, 96(2), pp. 1–21.

Gook, D. A., & Edgar, D. H. (2007) 'Human oocyte cryopreservation', *Human Reproduction Update*, 13(6), pp. 591–605.

Goverde, H. J., Dekker, H. S., Janssen, H. J., Bastiaans, L. A., Rolland, R., & Zielhuis, G. A. (1995) 'Semen quality and frequency of smoking and alcohol consumption: an explorative study', *International Journal of Fertility*, 40(3), pp. 135–138.

Gozlan, I., Dor, A., Farber, B., Meirow, D., Feinstein, S., & Levron, J. (2007) 'Comparing intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in patients with single oocyte retrieval', *Fertility and Sterility*, 87(3), pp. 515–518. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.07.1515.

Grigorescu, V., Zhang, Y., Kissin, D. M., Sauber-Schatz, E., Sunderam, M., Kirby, R. S., Hafsathou, D., McKane, P., & Jamieson, D. J. (2014) 'Maternal characteristics and pregnancy outcomes after assisted reproductive technology by infertility diagnosis: ovulatory dysfunction versus tubal obstruction', *Fertility and Sterility*, 101(4), pp. 1019–1025. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.12.030.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine & ESHRE Special Interest Group Embryology (2011) 'Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting', *Reproductive BioMedicine Online*, 22(6), pp. 632–646. doi: 10.1016/j.rbmo.2011.02.001.

Gulekli, B., Child, T. J., & Tan, S. L. (2009) 'Initial investigation of the patient (female and male)', in Gardner, D. K., Weissman, A., Howles, C. M., & Shoham, Z. (ed.) *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives*. 3rd edn. London: Informa Healthcare, pp. 459–468.

Gunes, S., Metin Mahmutoglu, A., Arslan, M. A., & Henkel, R. (2018) 'Smoking-induced genetic and epigenetic alterations in infertile men', *Andrologia*, 50(9), p. e13124. doi: 10.1111/and.13124.

Guzick, D. S., Overstreet, J. W., Factor-Litvak, P., Brazil, C. K., Nakajima, S. T., Coutifaris, C., Carson, S. A., Cisneiros, P., Steinkampf, M. P., Hill, J. A., Xu, D., & Vogel, D. L. (2001) 'Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men', *The New England Journal of Medicine*, 345(19), pp. 1388–1393.

American College of Obstetricians and Gynecologists (2013) 'ACOG Committee opinion no. 549: obesity in pregnancy', *Obstetrics and Gynecology*, 121(1), p. 213.

Hahn, K. A., Wise, L. A., Rothman, K. J., Mikkelsen, E. M., Brogly, S. B., Sørensen, H. T., Riis, A. H., & Hatch, E. E. (2015) 'Caffeine and caffeinated beverage consumption and risk of spontaneous abortion', *Human Reproduction*, 30(5), pp. 1246–1255. doi: 10.1093/humrep/dev063.

Hakim, R.B., Gray, R. H., & Zacur, H. (1998) 'Alcohol and caffeine consumption and decreased fertility', *Fertility and Sterility*, 70(4), pp. 632–637.

Hansen, M. L., Thulstrup, A. M., Bonde, J. P., Olsen, J., Håkonsen, L. B., & Ramlau-Hansen, C. H. (2012) 'Does last week's alcohol intake affect semen quality or reproductive hormones? A cross-sectional study among healthy young Danish men', *Reproductive Toxicology*, 34(3), pp. 457–462. doi: 10.1016/j.reprotox.2012.06.004.

Härkönen, M., & Ylikahri, R. (1983) 'Acute effects of alcohol on female sex hormones', *Clinical and Experimental Research*, 7(3), pp. 289–293.

Hatch, E. E., Wise, L. A., Mikkelsen, E. M., Christensen, T., Riis, A. H., Sørensen, H. T., & Rothman, K. J. (2012) 'Caffeinated beverage and soda consumption and time to pregnancy', *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 23(3), pp. 393–401. doi: 10.1097/EDE.0b013e31824cbaac.

Healy, M. W., Hill, M. J., & DeCherney, A. (2017) 'IVF: The First Four Decades', in Gardner, D. K., & Simón, C. (ed.) *Handbook of In Vitro Fertilization*. 4th edn. CRC Press.

Herrero, J., & Meseguer, M. (2013) 'Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics', *Fertility and Sterility*, 99(4), pp. 1030–1034. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.01.089.

Hochhauser, M. (1979) 'Bias in drug abuse survey research', *International Journal of the Addictions*, 14(5), pp. 675–687.

Holmila, M., & Raitasalo, K. (2005) 'Gender differences in drinking: why do they still exist?', *Addiction*, 100(12), pp. 1763–1769. doi: 10.1111/j.1360-0443.2005.01249.x.

Holoch, K. J., & Bruce, A. L. (2010) 'Endometriosis and Infertility', *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 53(2), pp. 429–438. doi: 10.1097/GRF.0b013e3181db7d71.

Homan, G. F., Davies, M., & Norman, R. (2007) 'The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review', *Human Reproduction Update*, 13(3), pp. 209–223.

Hornsby, P. P., Wilcox, A. J., & Weinberg, C. R. (1998) 'Cigarette smoking and disturbance of menstrual function', *Epidemiology*, 9(2), pp. 193–198.

Jahangirifar, M., Taebi, M., Nasr-Esfahani, M. H., & Askari, G. (2019) 'Dietary patterns and the outcomes of assisted reproductive techniques in women with primary infertility: a prospective cohort study', *International Journal of Fertility and Sterility*, 12(4), pp. 316–323. doi: 10.22074/ijfs.2019.5373.

Jensen, T. K., Andersson, A. M., Jørgensen, N., Andersen, A. G., Carlsen, E., & Skakkebaek, N. E. (2004) 'Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men', *Fertility and Sterility*, 82(4), pp. 863–870.

Jensen, T. K., Henriksen, T. B., Hjollund, N. H. I., Scheike, T., Kolstad, H., Giwercman, A., Ernst, E., Bonde, J. P., Skakkebaek, N. E., & Olsen, J. (1998) 'Caffeine intake and fecundability: a follow-up study among 430 Danish couples planning their first pregnancy', *Reproductive Toxicology*, 12(3), pp. 289–295.

Jensen, T. K., Swan, S. H., Skakkebaek, N. E., Rasmussen, S., & Jørgensen, N. (2010) 'Caffeine intake and semen quality in a population of 2,554 young Danish men', *American Journal of Epidemiology*, 171(8), pp. 883–891. doi: 10.1093/aje/kwq007.

Jha, P., Ranson, M. K., Nguyen, S. N., & Yach, D. (2002) 'Estimates of global and regional smoking prevalence in 1995, by age and sex', *American Journal of Public Health*, 92(6), pp. 1002–1006.

Joesbury, K. A., Edirisinghe, W. R., Phillips, M. R., & Yovich, J. L. (1998) 'Evidence that male smoking affects the likelihood of a pregnancy following IVF treatment: application of the modified cumulative embryo score', *Human Reproduction*, 13(6), pp. 1506–1513. doi: 10.1093/humrep/13.6.1506.

Jones, K. P., Hatasaka, H. H., Peterson, C. M., Aoki, V., Campbell, B., & Carrell, D. T. (2000) 'Body mass index (BMI) is inversely related to intrafollicular hCG levels and pregnancy rates of IVF patients', *Fertility and Sterility*, 74(3), p. S176.

de Jong, A. M. E., Menkveld, R., Lens, J. W., Nienhuis, S. E., & Rhemrev, J. P. T. (2014) 'Effect of alcohol intake and cigarette smoking on sperm parameters and pregnancy', *Andrologia*, 46(2), pp. 112–117. doi: 10.1111/and.12054.

Van de Kaa, D. J. (1987) 'Europe's second demographic transition', *Population Bulletin*, 42(1), pp. 1–59. Available at: <http://dx.doi.org/>.

Kaser, D. J., & Racowsky, C. (2014) 'Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review', *Human Reproduction Update*, 20(5), pp. 617–631. doi: 10.1093/humupd/dmu023.

Kassambara, A. (2017) 'R Package ggpubr: "ggplot2" Based Publication Ready Plots, version 0.2.3', *R package version 0.1*. Available at: <https://rpkgs.datanovia.com/ggpubr/>.

Khamsi, F., Yavas, Y., Roberge, S., Wong, J. C., Lacanna, I. C., & Endman, M. (2001) 'Intracytoplasmic sperm injection increased fertilization and good-quality embryo formation in patients with non-male factor indications for in vitro fertilization: a prospective randomized study', *Fertility and Sterility*, 75(2), pp. 342–347. doi: 10.1016/S0015-0282(00)01674-5.

Kirkegaard, K., Ahlström, A., Ingerslev, H. J., & Hardarson, T. (2015) 'Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology', *Fertility and Sterility*, 103(2), pp. 323–332. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.11.003.

Klonoff-Cohen, H., Bleha, J., & Lam-Kruglick, P. (2002) 'A prospective study of the effects of female and male caffeine consumption on the reproductive endpoints of IVF and gamete intra-Fallopian transfer', *Human Reproduction*, 17(7), pp. 1746–1754. doi: 10.1093/humrep/17.7.1746.

Klonoff-Cohen, H., Lam-Kruglick, P., & Gonzalez, C. (2003a) 'Effects of maternal and paternal alcohol consumption on the success rates of in vitro fertilization and gamete

intrafallopian transfer', *Fertility and Sterility*, 79(2), pp. 330–339. doi: 10.1016/S0015-0282(02)04582-X.

Klonoff-Cohen, H., Lam-Kruglick, P., & Gonzalez, C. (2003b) 'Effects of maternal and paternal alcohol consumption on the success rates of in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer', *Fertility and Sterility*, 79(2), pp. 330–339. doi: 10.1016/S0015-0282(02)04582-X.

Klonoff-Cohen, H. S., Natarajan, L., & Chen, R. V. (2006) 'A prospective study of the effects of female and male marijuana use on in vitro fertilization (IVF) and gamete intrafallopian transfer (GIFT) outcomes', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 194(2), pp. 369–376. doi: 10.1016/j.ajog.2005.08.020.

Kort, H. I., Massey, J. B., Elsner, C. W., Mitchell-Leef, D., Shapiro, D. B., Witt, M. A., & Roudebush, W. E. (2006) 'Impact of body mass index values on sperm quantity and quality', *Journal of Andrology*, 27(3), pp. 450–452.

Kovac, J. R., Addai, J., Smith, R. P., Coward, R. M., Lamb, D. J., & Lipshultz, L. I. (2013) 'The effects of advanced paternal age on fertility', *Asian Journal of Andrology*, 15(6), pp. 723–728. doi: 10.1038/aja.2013.92.

Kovalevsky, G., & Patrizio, P. (2005) 'High rates of embryo wastage with use of assisted reproductive technology: a look at the trends between 1995 and 2001 in the United States', *Fertility and sterility*, 84(2), pp. 325–330. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.04.020.

Kraft, A. D., Palombo, J., Mitchell, D., Dean, C., Meyers, S., & Schmidt, A. W. (1980) 'The psychological dimensions of infertility', *American Journal of Orthopsychiatry*, 50(4), pp. 618–628.

Kucuk, M., Doymaz, F., & Urman, B. (2010) 'Effect of energy expenditure and physical activity on the outcomes of assisted reproduction treatment', *Reproductive BioMedicine Online*, 20(2), pp. 274–279. doi: 10.1016/j.rbmo.2009.11.011.

Künzle, R., Mueller, M. D., Hänggi, W., Birkhäuser, M. H., Drescher, H., & Bersinger, N. A. (2003) 'Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples', *Fertility and Sterility*, 79(2), pp. 287–291.

Kupka, M. S., Ferraretti, A. P., De Mouzon, J., Erb, K., D'Hooghe, T., Castilla, J. A., Calhaz-Jorge, C., De Geyter, C., Goossens, V., & European IVF-Monitoring Consortium (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) (2014) 'Assisted reproductive technology in Europe , 2010: results generated from European registers by ESHRE', *Human Reproduction*, 29(10), pp. 2099–2113. doi: 10.1093/humrep/deu175.

Landecker, H. (2006) 'Microcinematography and the history of science and film', *The University of Chicago Press*, 97(1), pp. 121–132.

Leridon, H. (2006) 'Demographic effects of the introduction of steroid contraception in developed countries', *Human Reproduction Update*, 12(5), pp. 603–616. doi: 10.1093/humupd/dml025.

Li, Y., Lin, H., Li, Y., & Cao, J. (2011) 'Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses', *Fertility and Sterility*, 95(1), pp. 116–123.

Li, Z., Wang, A. Y., Bowman, M., Hammarberg, K., Farquhar, C., Johnson, L., Safi, N., & Sullivan, E. A. (2018) 'ICSI does not increase the cumulative live birth rate in non-male factor infertility', *Human Reproduction*, 33(7), pp. 1322–1330. doi: 10.1093/humrep/dey118.

Lieber, C. S. (1990) 'Alcoholism: a disease of internal medicine', *Journal of Studies on Alcohol*, 51(2), pp. 101–103.

Loh, S., Wang, J. X., & Matthews, C. D. (2002) 'The influence of body mass index, basal FSH and age on the response to gonadotrophin stimulation in non-polycystic ovarian syndrome patients', *Human Reproduction*, 17(5), pp. 1207–1211.

Macaluso, M., Wright-Schnapp, T. J., Chandra, A., Johnson, R., Satterwhite, C. L., Pulver, A., Berman, S. M., Wang, R. Y., Farr, S. L., & Pollack, L. A. (2010) 'A public health focus on infertility prevention, detection, and management', *Fertility and Sterility*, 93(1), pp. 16.e1-16.e10. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.09.046.

Macklon, N. S., Broekmans, F. J., & Fauser, B. C. (2009) 'Indications for IVF treatment: from diagnosis to prognosis', in *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives*. London: Informa Healthcare, pp. 453–455.

Macklon, N. S., Geraedts, J. P., & Fauser, B. C. (2002) 'Conception to ongoing pregnancy: The "black box" of early pregnancy loss', *Human Reproduction Update*, 8(4), pp. 333–343. doi: 10.1093/humupd/8.4.333.

Magnusdottir, E. V., Thorsteinsson, T., Thorsteinsdottir, S., Heimisdottir, M., & Olafsdottir, K. (2005) 'Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility', *Human Reproduction*, 20(1), pp. 208–215.

Markstrom, E., Svensson, E., Shao, R., Svanberg, B., & Billig, H. (2002) 'Survival factors regulating ovarian apoptosis - dependence on follicle differentiation', *Reproduction*, 123(1), pp. 23–30. doi: 10.1530/rep.0.1230023.

Martin, K. L. (2000) 'Nutritional and metabolic requirements of early cleavage stage embryos and blastocysts', *Human Fertility*, 3(4), pp. 247–254. doi: 10.1080/1464727002000199071.

Martini, A. C., Molina, R. I., Estofán, D., Senestrari, D., de Cuneo, M. F., & Ruiz, R. D. (2004) 'Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality', *Fertility and Sterility*, 82(2), pp. 374–377. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.03.022.

Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. (2012) 'National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys', *PLoS Medicine*, 9(12), p. e1001356. doi: 10.1371/journal.pmed.1001356.

McPherson, N. O., Bell, V. G., Zander-Fox, D. L., Fullston, T., Wu, L. L., Robker, R. L., & Lane, M. (2015) 'When two obese parents are worse than one! Impacts on embryo and fetal development', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 309(6), pp. 568–581. doi: 10.1152/ajpendo.00230.2015.

Merhi, Z. O., Keltz, J., Zapantis, A., Younger, J., Berger, D., Lieman, H. J., Jintal, S. K., & Polotsky, A. J. (2013) 'Male adiposity impairs clinical pregnancy rate by in vitro fertilization without affecting day 3 embryo quality', *Obesity*, 21(8), pp. 1608–1612. doi: 10.1002/oby.20164.

Metwally, M., Ong, K. J., Ledger, W. L., & Li, T. C. (2008) 'Does high body mass index increase the risk of miscarriage after spontaneous and assisted conception? A meta-analysis of the evidence', *Fertility and sterility*, 90(3), pp. 714–726. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.07.1290.

Mikkelsen, T. F., Graff-Iversen, S., Sundby, J., & Bjertness, E. (2007) 'Early menopause, association with tobacco smoking, coffee consumption and other lifestyle

factors: a cross-sectional study', *BMC Public Health*, 7(1), p. 149. doi: 10.1186/1471-2458-7-149.

Mikkelsen, T. F., Graff-Iversen, S., Sundby, J., & Bjertness, E. (2007) 'Early menopause, association with tobacco smoking, coffee consumption and other lifestyle factors: a cross-sectional study', *BMC Public Health*, 7(1), p. 149. doi: 10.1186/1471-2458-7-149.

Montag, M., Liebenthron, J., & Köster, M. (2011) 'Which morphological scoring system is relevant in human embryo development?', *Placenta*, 32, pp. S252–S256. doi: 10.1016/j.placenta.2011.07.009.

Monteiro, J., Alves, M., Oliveira, P., & Silva, B. (2016) 'Structure-bioactivity relationships of methylxanthines: trying to make sense of all the promises and the drawbacks', *Molecules*, 21(8), pp. 974–1005. doi: 10.3390/molecules21080974.

Moragianni, V. A., Jones, S. M. L., & Ryley, D. A. (2012) 'The effect of body mass index on the outcomes of first assisted reproductive technology cycles', *Fertility and Sterility*, 98(1), pp. 102–108. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.04.004.

Mostafa, T. (2010) 'Cigarette smoking and male infertility', *Journal of Advanced Research*, 1(3), pp. 179–186. doi: 10.1016/j.jare.2010.05.002.

Must, A., Spadano, J., Coakley, E. H., Field, A. E., Colditz, G., & Dietz, W. H. (1999) 'The disease burden associated with overweight and obesity', *Jama*, 282(16), pp. 1523–1529.

Muthusami, K. R., & Chinnaswamy, P. (2005) 'Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality', *Fertility and Sterility*, 84(4), pp. 919–924. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.04.025.

Nachtigall, R. D. (2006) 'International disparities in access to infertility services', *Fertility and Sterility*, 85(4), pp. 871–875. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.08.066.

Nakahara, T., Iwase, A., Goto, M., Harata, T., Suzuki, M., Ienaga, M., Kobayashi, H., Takikawa, S., Manabe, S., Kikkawa, F., & Ando, H. (2010) 'Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27(2–3), pp. 93–96. doi: 10.1007/s10815-010-9385-8.

Nelder, J. A., & Wedderburn, R. W. (1972) 'Generalized linear models', *Journal of the Royal Statistical Society: Series A (General)*, 135(3), pp. 370–384. Available at: <http://www.jstor.org/stable/2344614> .

Norman, R. J., Noakes, M., Wu, R., Davies, M. J., Moran, L., & Wang, J. X. (2004) 'Improving reproductive performance in overweight/obese women with effective weight management', *Human Reproduction Update*, 10(3), pp. 267–280. doi: 10.1093/humupd/dmh018.

Nyboe Andersen, A., Goossens, V., Ferraretti, A. P., Bhattacharya, S., Felberbaum, R., De Mouzon, J., & Nygren, K. G., & European IVF-Monitoring Consortium (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) (2008) 'Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE', *Human Reproduction*, 23(4), pp. 756–771.

O'Flynn, N. (2014) 'Assessment and treatment for people with fertility problems: NICE guideline', *British Journal of General Practice*, 64(618), pp. 50–51. doi: 10.3399/bjgp14X676609.

Ombelet, W., Cooke, I., Dyer, S., Serour, G., & Devroey, P. (2008) 'Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries', *Human Reproduction Update*, 14(6), pp. 605–21.

Ombelet, W. (2009) 'Reproductive healthcare systems should include accessible infertility diagnosis and treatment: an important challenge for resource-poor countries', *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 106(2), pp. 168–171. doi: 10.1016/j.ijgo.2009.03.033.

Pajarinen, J., Karhunen, P. J., Savolainen, V., Lalu, K., Penttilä, A., & Laippala, P. (1996) 'Moderate alcohol consumption and disorders of human spermatogenesis', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 20(2), pp. 332–337. doi: 10.1111/j.1530-0277.1996.tb01648.x.

Partridge, A. H., Gelber, S., Peppercorn, J., Sampson, E., Knudsen, K., Laufer, M., Rosenberg, R., Przypyszny, M., Rein, A., & Winer, E. P. (2004) 'Web-based survey of fertility issues in young women with breast cancer', *Journal of Clinical Oncology*, 22(20), pp. 4174–4183. doi: 10.1200/JCO.2004.01.159.

Pauli, E. M., Legro, R. S., Demers, L. M., Kunselman, A. R., Dodson, W. C., & Lee, P. A. (2008) 'Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in men', *Fertility and Sterility*, 90(2), pp. 346–351. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.06.046.

Payne, D., Flaherty, S. P., Barry, M. F., & Matthews, C. D. (1997) 'Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography', *Human Reproduction*, 12(3), pp. 532–541.

De Placido, G., Wilding, M., Strina, I., Alviggi, E., Alviggi, C., Mollo, A., Varicchio, M. T., Tolino, A., Schiattarella, C., & Dale, B. (2002) 'High outcome predictability after IVF

using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate', *Human Reproduction*, 17(9), pp. 2402–2409. doi: 10.1093/humrep/17.9.2402.

Plas, E., Berger, P., Hermann, M., & Pflüger, H. (2000) 'Effects of aging on male fertility?', *Experimental Gerontology*, 35(5), pp. 543–551. doi: 10.1016/S0531-5565(00)00120-0.

The Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology (2012) 'Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non-male factor infertility: A committee opinion', *Fertility and Sterility*, 98(6), pp. 1395–1399. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.08.026.

Quinn, G. P., & Keough, M. J. (2002) *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press.

Racowsky, C., Combelles, C. M., Nureddin, A., Pan, Y., Finn, A., Miles, L., Gale, S., O'Leary, T., & Jackson, K. V. (2003) 'Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability', *Reproductive BioMedicine Online*, 6(3), pp. 323–331. doi: 10.1016/S1472-6483(10)61852-4.

Ramlau-Hansen, C. H., Thulstrup, A. M., Aggerholm, A. S., Jensen, M. S., Toft, G., & Bonde, J. P. (2007) 'Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis', *Human Reproduction*, 22(1), pp. 188–196. doi: 10.1093/humrep/del364.

Ramlau-Hansen, C. H., Thulstrup, A. M., Bonde, J. P., Olsen, J., & Bech, B. H. (2008) 'Semen quality according to prenatal coffee and present caffeine exposure: two decades of follow-up of a pregnancy cohort', *Human Reproduction*, 23(12), pp. 2799–2805.

Ricci, E., Al Beitawi, S., Cipriani, S., Candiani, M., Chiaffarino, F., Vigano, P., Noli, S., & Parazzini, F. (2017) 'Semen quality and alcohol intake: a systematic review and meta-analysis', *Reproductive BioMedicine Online*, 34(1), pp. 38–47. doi: 10.1016/j.rbmo.2016.09.012.

Ricci, E., Viganò, P., Cipriani, S., Somigliana, E., Chiaffarino, F., Bulfoni, A., & Parazzini, F. (2017) 'Coffee and caffeine intake and male infertility: a systematic review', *Nutrition journal*, 16(1), pp. 37–50. doi: 10.1186/s12937-017-0257-2.

Ripley, B., Venables, B., Bates, D. M., Hornik, K., Gebhardt, A., & Firth, D. (2019) 'R Package "mass", version 7.3-51.4', *Cran R*. Available at: <http://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4/>.

Ritz, C., & Streibig, J. C. (2008) 'Nonlinear Regression with R', *Springer Science & Business Media*.

Rosen, M. P., Shen, S., Rinaudo, P. F., Huddleston, H. G., McCulloch, C. E., & Cedars, M. I. (2010) 'Fertilization rate is an independent predictor of implantation rate', *Fertility and Sterility*, 94(4), pp. 1328–1333. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.05.024.

Rubes, J., Lowe, X., Moore II, D., Perreault, S., Slott, V., Evenson, D., Selevan, S. G., & Wyrobek, A. J. (1998) 'Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men', *Fertility and Sterility*, 70(4), pp. 715–723. doi: 10.1016/S0015-0282(98)00261-1.

Rutstein, S. O., & Shah, I. H. (2004) 'DHS Comparative Reports 9 – World Health Organization: Infecundity, Infertility, and Childlessness in Developing Countries'. Calverton, Maryland, USA: ORC Macro and the World Health Organization.

Saleh, R. A., Agarwal, A., Sharma, R. K., Nelson, D. R., & Thomas Jr, A. J. (2002) 'Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study', *Fertility and Sterility*, 78(3), pp. 491–499.

Saraiya, M., Berg, C. J., Kendrick, J. S., Strauss, L. T., Atrash, H. K., & Ahn, Y. W. (1998) 'Cigarette smoking as a risk factor for ectopic pregnancy', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 178(3), pp. 493–498.

Sartorius, G. A., & Nieschlag, E. (2009) 'Paternal age and reproduction', *Human Reproduction Update*, 16(1), pp. 65–79. doi: 10.1093/humupd/dmp027.

Schliep, K. C., Schisterman, E. F., Mumford, S. L., Pollack, A. Z., Zhang, C., Ye, A., Stanford, J. B., Hammoud, A. O., Porucznik, C. A., & Wactawski-Wende, J. (2012) 'Caffeinated beverage intake and reproductive hormones among premenopausal women in the BioCycle Study', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95(2), pp. 488–497. doi: 10.3945/ajcn.111.021287.1.

Seli, E., Vergouw, C. G., Morita, H., Botros, L., Roos, P., Lambalk, C. B., Yamashita, N., Kato, O., & Sakkas, D. (2010) 'Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer', *Fertility and Sterility*, 94(2), pp. 535–542. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.03.078.

Sepaniak, S., Forges, T., Gerard, H., Foliguet, B., Bene, M. C., & Monnier-Barbarino, P. (2006) 'The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation', *Toxicology*, 223(1–2), pp. 54–60. doi: 10.1016/j.tox.2006.03.001.

Sharma, R., Biedenharn, K. R., Fedor, J. M., & Agarwal, A. (2013) 'Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility', *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(1), p. 66.

Sharma, R., Harlev, A., Agarwal, A., & Esteves, S. C. (2016) 'Cigarette smoking and semen quality: a new meta-analysis examining the effect of the 2010 World Health Organization laboratory methods for the examination of human semen', *European Urology*, 70(4), pp. 635–645. doi: 10.1016/j.eururo.2016.04.010.

Shi, Q., Ko, E., Barclay, L., Hoang, T., Rademaker, A., & Martin, R. (2001) 'Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm', *Molecular Reproduction and Development*, 59(4), pp. 417–421.

Smeenk, J. M. J., Verhaak, C. M., Eugster, A., Van Minnen, A., Zielhuis, G. A., & Braat, D. D. M. (2001) 'The effect of anxiety and depression on the outcome of in-vitro fertilization', *Human Reproduction*, 16(7), pp. 1420–1423. doi: 10.1093/humrep/16.7.1420.

Soares, S. R., & Melo, M. A. (2008) 'Cigarette smoking and reproductive function', *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 20(3), pp. 281–291.

Soares, S. R., Troncoso, C., Bosch, E., Serra, V., Simón, C., Remohí, J., & Pellicer, A. (2005) 'Age and uterine receptiveness: predicting the outcome of oocyte donation cycles', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(7), pp. 4399–4404. doi: 10.1210/jc.2004-2252.

Sobral, D., Barata, M., Carvalho, M.J., Reis, S., & Sousa, S. (2012) 'Estilos de Vida e Reprodução', in *Orientações Técnicas em Medicina da Reprodução*. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução, pp. 9–32.

Spandorfer, S. D., Davis, O. K., Barmat, L. I., Chung, P. H., & Rosenwaks, Z. (2004) 'Relationship between maternal age and aneuploidy in in vitro fertilization pregnancy loss', *Fertility and Sterility*, 81(5), pp. 1265–1269. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.09.057.

Steer, C. V., Mills, C. L., Tan, S. L., Campbell, S., & Edwards, R. G. (1992) 'The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme', *Human Reproduction*, 7(1), pp. 117–119. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137542.

Stephens, P. C. V., & Edwards, R. G. (1978) 'Birth after the reimplantation of human embryo', *The Lancet*, 2(366).

Streissguth, A. P., Landesman-Dwyer, S., Martin, J. C., & Smith, D. W. (1980) 'Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals', *Science*, 209(4454), pp. 353–361.

Sunderam, S., Kissin, D. M., Crawford, S. B., Folger, S. G., Boulet, S. L., Warner, L., & Barfield, W. D. (2018) 'Assisted Reproductive Technology Surveillance — United States, 2015', *MMWR Surveillance Summaries*, 67(3), p. 1.

Svartberg, J., Midtby, M., Bonaa, K. H., Sundsfjord, J., Joakimsen, R. M., & Jorde, R. (2003) 'The associations of age, lifestyle factors and chronic disease with testosterone in men: the Tromsø Study', *European Journal of Endocrinology*, 149(2), pp. 145–152.

Swain, J. E., & Pool, T. B. (2008) 'ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization', *Human Reproduction Update*, 14(5), pp. 431–446. doi: 10.1093/humupd/dmn025.

Tannus, S., Son, W. Y., Gilman, A., Younes, G., Shavit, T., & Dahan, M. H. (2017) 'The role of intracytoplasmic sperm injection in non-male factor infertility in advanced maternal age', *Human Reproduction*, 32(1), pp. 119–124. doi: 10.1093/humrep/dew298.

Taylor, T. H., Wright, G., Jones-Colon, S., Mitchell-Leef, D., Kort, H. I., & Nagy, Z. P. (2008) 'Comparison of ICSI and conventional IVF in patients with increased oocyte immaturity', *Reproductive BioMedicine Online*, 17(1), pp. 46–52. doi: 10.1016/S1472-6483(10)60292-1.

R Core Team (2019) 'R: A language and environment for statistical computing'. Vienna, Austria. Available at: <https://www.r-project.org/>.

Teijon, M. L., Garcia, F., Serra, O., Moragas, M., Rabanal, A., Olivares, R., & Alvarez, J. G. (2007) 'Semen quality in a population of volunteers from the province of Barcelona', *Reproductive BioMedicine Online*, 15(4), pp. 434–444. doi: 10.1016/S1472-6483(10)60370-7.

Terriou, P., Sapin, C., Giorgetti, C., Hans, E., Spach, J. L., & Roulier, R. (2001) 'Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age', *Fertility and Sterility*, 75(3), pp. 525–531.

Thornhill, A. R., DeDie-Smulders, C. E., Geraedts, J. P., Harper, J. C., Harton, G. L., Lavery, S. A., Moutou, C., Robinson, M. D., Schmutzler, A. G., Scriven, P. N., Sermon, K. D., & Wilton, L. (2005) 'ESHRE PGD Consortium: Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)', *Human Reproduction*, 20(1), pp. 35–48. doi: 10.1093/humrep/deh579.

Tremellen, K. (2008) 'Oxidative stress and male infertility — a clinical perspective', *Human Reproduction Update*, 14(3), pp. 243–258.

Trummer, H., Habermann, H., Haas, J., & Pummer, K. (2002) 'The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones', *Human Reproduction*, 17(6), pp. 1554–1559.

Tucker, M., Graham, J., Han, T., Stillman, R., & Levy, M. (2001) 'Conventional insemination versus intracytoplasmic sperm injection', *The Lancet*, 358(9293), pp. 1645–1646.

Vasconcelos, M., Albuquerque, R., & Seixas, J. (2014) 'Papel de um Enfermeiro num Centro de Reprodução Medicamente Assistida - Fator Masculino', in Barros, F., & Figueiredo, R. (eds) *Manual de Medicina Sexual - Visão Multidisciplinar*. Lisbon: HSJ, Consultores, Lda., pp. 513–518.

Veeranki, S. P., Mamudu, H. M., Anderson, J. L., & Zheng, S. (2014) 'Worldwide never-smoking youth susceptibility to smoking', *Journal of Adolescent Health*, 54(2), pp. 144–150. doi: 10.1016/j.jadohealth.2013.07.036.

Te Velde, E. R., & Pearson, P. L. (2002) 'The variability of female reproductive ageing', *Human Reproduction Update*, 8(2), pp. 141–154. doi: 10.1093/humupd/8.2.141.

Villamor, E., & Cnattingius, S. (2006) 'Interpregnancy weight change and risk of adverse pregnancy outcomes: a population-based study', *The Lancet*, 368(9542), pp. 1164–1170.

Vine, M. F., Chiu-Kit, J. T., Hu, P. C., & Truong, K. Y. (1996) 'Cigarette smoking and semen quality', *Fertility and Sterility*, 65(4), pp. 835–842. doi: 10.1016/S0015-0282(16)58223-5.

Van Voorhis, B. J., Dawson, J. D., Stovall, D. W., Sparks, A. E., & Syrop, C. H. (1996) 'The effects of smoking on ovarian function and fertility during assisted reproduction cycles', *Obstetrics and Gynecology*, 88(5), pp. 785–791. doi: 10.1016/0029-7844(96)00286-4.

Wallberg, F., Tenev, T., & Meier, P. (2016) 'Time-lapse imaging of cell death', *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(3), pp. 251–259. doi: 10.1101/pdb.prot087395.

Wallock, L. M., Tamura, T., Mayr, C. A., Johnston, K. E., Ames, B. N., & Jacob, R. A. (2001) 'Low seminal plasma folate concentrations are associated with low sperm density and count in male smokers and nonsmokers', *Fertility and Sterility*, 75(2), pp. 252–259.

Wang, S. L., Wang, X. R., Chia, S. E., Shen, H. M., Song, L., Chen, H. Y., & Ong, C. N. (2001) 'A Study on occupational exposure to petrochemicals and smoking on seminal quality', *Journal of Andrology*, 22(1), pp. 73–78.

Warburton, D. (2005) 'Biological aging and the etiology of aneuploidy', *Cytogenetic and Genome Research*, 111(3–4), pp. 266–272. doi: 10.1159/000086899.

Waylen, A. L., Metwally, M., Jones, G. L., Wilkinson, A. J., & Ledger, W. L. (2009) 'Effects of cigarette smoking upon clinical outcomes of assisted reproduction: a meta-analysis', *Human Reproduction Update*, 15(1), pp. 31–44. doi: 10.1093/humupd/dmn046.

Wdowiak, A., Lewicka, M., Plewka, K., & Bakalczuk, G. (2013) 'Nicotinism and quality of embryos obtained in in-vitro fertilization programmes', *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20(1), pp. 82–85.

Wdowiak, A., Sulima, M., Sadowska, M., Bakalczuk, G., & Bojar, I. (2014) 'Alcohol consumption and quality of embryos obtained in programmes of in vitro fertilization', *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 21(2), pp. 450–453. doi: 10.5604/1232-1966.1108623.

Wells, D., & Delhanty, J. D. (2000) 'Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative

genomic hybridization', *Molecular Human Reproduction*, 6(11), pp. 1055–1062. doi: 10.1093/molehr/6.11.1055.

Wesselink, A. K., Wise, L. A., Rothman, K. J., Hahn, K. A., Mikkelsen, E. M., Mahalingaiah, S., & Hatch, E. E. (2016) 'Caffeine and caffeinated beverage consumption and fecundability in a preconception cohort', *Reproductive Toxicology*, 62, pp. 39–45. doi: 10.1016/j.reprotox.2016.04.022.

Whitman-Elia, G. F., & Baxley, E. G. (2001) 'A primary care approach to the infertile couple', *The Journal of the American Board of Family Practice*, 14(1), pp. 33–45.

World Health Organization (2005) 'Gender in lung cancer and smoking research', pp. 1–43.

Wilcox, A., Weinberg, C., & Baird, D. (1988) 'Caffeinated beverages and decreased fertility', *The Lancet*, 332(8626–8627), pp. 1453–1456.

Wilsnack, R. W., Vogeltanz, N. D., Wilsnack, S. C., & Harris, T. R. (2000) 'Gender differences in alcohol consumption and adverse drinking consequences: cross-cultural patterns', *Addiction*, 95(2), pp. 251–265.

Windham, G. C., Elkin, E. P., Swan, S. H., Waller, K. O., & Fenster, L. (1999) 'Cigarette smoking and effects on menstrual function', *Obstetrics & gynecology*, 93(1), pp. 59–65.

Wong, M. Y., & Ledger, W. L. (2013) 'Is ICSI risky?', *Obstetrics and Gynecology International*, 2013, pp. 473289. doi: 10.1155/2013/473289.

Wong, W. Y., Thomas, C. M., Merkus, H. M., Zielhuis, G. A., Doesburg, W. H., & Steegers-Theunissen, R. P. (2000) 'Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma', *Fertility and Sterility*, 74(5), pp. 2–7.

World Health Organization (2010) *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm–cervical mucus interaction*. 5th edn. Cambridge: Cambridge University Press.

Yoeli, R., Orvieto, R., Ashkenazi, J., Shelef, M., Ben-Rafael, Z., & Bar-Hava, I. (2008) 'Comparison of embryo quality between intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in sibling oocytes', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 25(1), pp. 23–28. doi: 10.1007/s10815-007-9188-8.

Zavos, P. M., Correa, J. R., Antypas, S., Zarmakoupis-Zavos, P. N., & Zarmakoupis, C. N. (1998) 'Effects of seminal plasma from cigarette smokers on sperm viability and longevity', *Fertility and Sterility*, 69(3), pp. 425–429.

Zenzes, M. T., Puy, L. A., Bielecki, R., & Reed, T. E. (1999) 'Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in embryos from smoking couples: evidence for transmission by spermatozoa', *Molecular Human Reproduction*, 5(2), pp. 125–131. doi: 10.1093/molehr/5.2.125.

Zenzes, M. T. (2000) 'Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos', *Human Reproduction Update*, 6(2), pp. 122–131.

Zumoff, B., Miller, L., Levit, C. D., Miller, E. H., Heinz, U., Kalin, M., Denman, H., Jandorek, R., & Rosenfeld, R. S. (1990) 'The effect of smoking on serum progesterone, estradiol, and luteinizing hormone levels over a menstrual cycle in normal women', *Steroids*, 55(11), pp. 507–511.

Zuur, A., Ieno, E. N., Walker, N., Saveliev, A. A., & Smith, G. M. (2009) *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Springer Science & Business Media.

7. Anexos

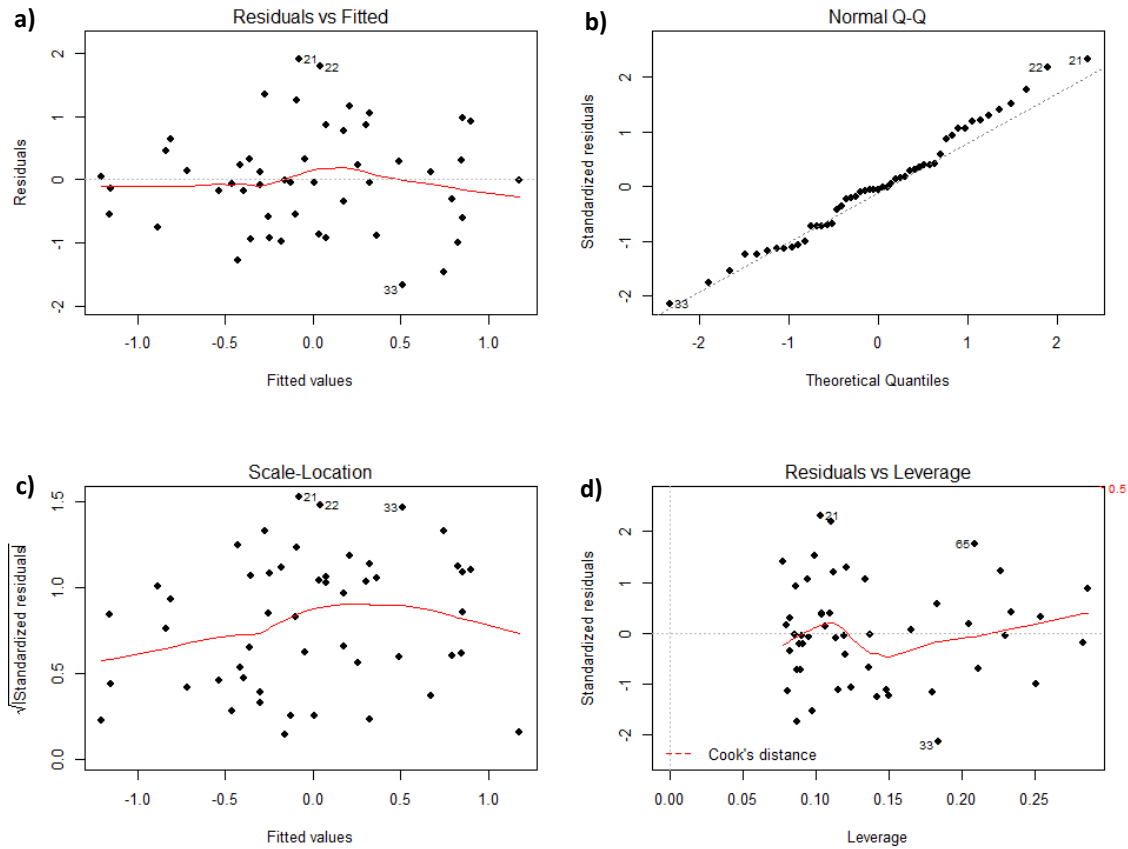


Figura s1. Exemplo de gráficos de diagnóstico utilizados para o modelo selecionado para a qualidade embrionária ao 5º dia. São quatro resultados que revelam se o modelo é ou não bem ajustado aos dados: a) e c) representam os residuais (estandardizados ou não) relativamente aos valores previstos, onde a aproximação de uma linha reta indica bom ajuste; b) representa o ajuste dos quantis teóricos aos residuais estandardizados, onde a aproximação dos valores à reta tracejada representa um ajuste adequado; e d) que utiliza a *distância de Cook* para verificar se existem alguns valores individuais de residuais que possam ser problemáticos para o modelo. Como nenhum valor se aproxima da linha que representa a *distância de Cook*, esta não se encontra sequer visível, indicando novamente um bom ajuste dos residuais do modelo.

QUESTIONÁRIO – ESTILOS DE VIDA

Processo nº:

As questões aqui formuladas têm como objetivo compreender os hábitos do paciente, de forma a que posteriormente se possa analisar a sua influência na qualidade dos gametas e embriões e ajudar os casais em tratamento. Ao assinar este questionário estará a autorizar a análise dos dados recolhidos para futura publicação científica, no entanto, as informações fornecidas serão todas mantidas em **absoluto anonimato**. Pedimos que responda com a máxima veracidade.

Idade: _____ Peso: _____ Altura: _____ Sexo: _____

1. Já fumou ou costuma fumar?

☐ NÃO

☐ SIM, fumo **Com que frequência?** (ex. 1 maço por dia; 1 cigarro todos os dias; 2 cigarros ao fim de semana, etc...) _____

☐ SIM, já fumei **Há quanto tempo parou e com que frequência fumava?** _____

2. Consome ou já consumiu bebidas alcoólicas?

☐ NÃO

☐ SIM, consumo **Com que frequência?** (ex. 1 copo de vinho ao almoço e ao jantar; 1 cerveja todos os dias; 2 bebidas brancas ao fim de semana, etc...) _____

☐ SIM, já consumi **Há quanto tempo parou e com que frequência consumia?** _____

3. Costuma beber café?

☐ NÃO

☐ SIM **Com que frequência?** (ex. 3 cafés por dia; 1 café depois do almoço; 1 café ao fim de semana, etc...) _____

4. Consome ou já consumiu drogas recreativas?

☐ NÃO

☐ SIM, consumo **Com que frequência?** _____

☐ SIM, já consumi **Há quanto tempo parou e com que frequência consumia?** _____

Data ____/____/____ Assinatura do paciente _____

Figura s2. Questionário sobre os estilos de vida elaborado pelos autores.

Tabela s1. Melhor modelo geral linearizado selecionado com função *stepAIC* para prever a variação da qualidade morfológica espermática nos indivíduos amostrados. São apresentados: a estimativa β associada a cada parâmetro e erro padrão correspondente a esta estimativa, assim como o *z-score* e *p-value* associado a cada parâmetro. O símbolo “.” representa proximidade de significância.

	β	Erro padrão	<i>z</i>	<i>p-value</i>
Intercept	-43.01	16495.15	-0.003	1.00
tabaco 2	-9.04	7.22	-1.25	0.21
tabaco 3	-1.29	2.79	-0.46	0.64
café 2	20.14	17585.08	0.001	1.00
café 3	21.25	11302.61	0.002	1.00
álcool 2	66.14	24216.86	0.003	1.00
álcool 3	21.33	12014.21	0.002	1.00
IMC	2.49	1.68	1.48	0.14
idade	3.26	1.82	1.79	0.07 .
tabaco 2: café 2	61.82	19677.63	0.003	1.00
tabaco 3: café 2	0.81	3.89	0.21	0.83
café 2: álcool 2	-66.85	26390.23	-0.003	1.00
café 3: álcool 2	-36.11	21026.53	-0.002	1.00
café 2: álcool 3	-2.92	13471.68	0.000	1.00
IMC: idade	-2.89	2.39	-1.21	0.23

Tabela s2. Melhor modelo de regressão de mínimos quadrados selecionado com função *stepAIC* para prever a variação da qualidade morfológica espermática nos indivíduos amostrados. São apresentados: a estimativa β associada a cada parâmetro e erro padrão correspondente a esta estimativa, assim como o *t-score* e *p-value* associado a cada parâmetro. O símbolo “.” representa proximidade de significância.

	β	Erro padrão	<i>t</i>	<i>p-value</i>
Intercept	0.70	0.06	11.77	~ 0
tabaco 2	-0.20	0.18	-1.13	0.26
tabaco 3	-0.10	0.21	-0.46	0.65
café 2	-0.14	0.08	-1.67	0.10
café 3	-0.027	0.12	-0.22	0.82
tabaco 2: café 2	0.48	0.21	2.30	0.027 *
tabaco 3: café 2	0.21	0.24	0.90	0.37

Tabela s3. Melhor modelo de regressão de mínimos quadrados selecionado com função *stepAIC* para prever a qualidade embrionária ao 3º dia resultante dos indivíduos amostrados. São apresentados: a estimativa β associada a cada parâmetro e erro padrão correspondente a esta estimativa, assim como o *t-score* e *p-value* associado a cada parâmetro. O símbolo “.” representa proximidade de significância.

	β	Erro padrão	<i>z</i>	<i>p-value</i>
Intercept	-0.46	0.43	-1.06	0.29
tabaco 2	1.58	1.23	1.29	0.20
tabaco 3	-1.07	1.71	-0.62	0.54
café 2	-0.24	0.50	-0.49	0.63
café 3	0.85	0.96	0.88	0.38
álcool 2	1.13	0.58	1.94	0.058 .
álcool 3	0.07	0.66	0.10	0.92
idade	0.30	0.11	2.65	0.011 *
tabaco 2: café 2	-1.12	0.84	-1.33	0.19
tabaco 3: café 2	2.23	1.93	1.15	0.25
tabaco 3: café 3	-0.40	1.20	-0.33	0.74
tabaco 2: álcool 2	-1.73	1.06	-1.62	0.11
tabaco 3: álcool 2	2.38	1.43	1.67	0.10
tabaco 2: álcool 3	-2.04	1.58	-1.29	0.20
tabaco 3: álcool 3	0.58	1.41	0.41	0.68
café 2: álcool 2	0.77	0.74	1.04	0.31
café 3: álcool 2	-1.61	1.12	-1.43	0.16
café 2: álcool 3	0.31	0.77	0.40	0.69
café 3: álcool 3	-0.59	1.19	-0.49	0.62
tabaco 3: café 2: álcool 2	-3.61	1.78	-2.03	0.048 *
tabaco 3: café 2: álcool 3	-1.02	1.76	-0.58	0.57

Tabela s4. Melhor modelo de regressão de mínimos quadrados selecionado com função *stepAIC* para prever a qualidade embrionária ao 5º dia resultante dos indivíduos amostrados. São apresentados: a estimativa β associada a cada parâmetro e erro padrão correspondente a esta estimativa, assim como o *t-score* e *p-value* associado a cada parâmetro. O símbolo “.” representa proximidade de significância.

	β	Erro padrão	<i>t</i>	<i>p-value</i>
Intercept	-0.47	0.25	-1.93	0.060 .
tabaco 2	-0.96	0.42	-2.26	0.029 *
tabaco 3	0.25	0.30	0.83	0.41
álcool 2	0.91	0.33	2.80	0.0075 *
álcool 3	0.46	0.33	1.40	0.17
IMC	-0.30	0.13	-2.25	0.029 *
idade	0.36	0.12	2.98	0.0047 *