UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO

FATORES ASSOCIADOS ÀS CONCENTRAÇÕES DAS VITAMINAS DO COMPLEXO B E COLINA NO LEITE HUMANO: UM ESTUDO PROSPECTIVO NO RIO DE JANEIRO

MÔNICA ARAUJO BATALHA

RIO DE JANEIRO

2021

MÔNICA ARAUJO BATALHA

FATORES ASSOCIADOS ÀS CONCENTRAÇÕES DAS VITAMINAS DO COMPLEXO B E COLINA NO LEITE HUMANO: UM ESTUDO PROSPECTIVO NO RIO DE JANEIRO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para à obtenção do título de Doutora em Ciências Nutricionais.

Orientador: Professor Dr. Gilberto Kac

RIO DE JANEIRO

2021

Batalha, Mônica Araujo
B328f Fatores associados às concentrações das vitaminas do complexo B e colina no leite humano: um estudo prospectivo no Rio de Janeiro. / Mônica Araujo Batalha. -- Rio de Janeiro, 2021.
218 f.

Orientador: Gilberto Kac.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2021.

1. Leite Humano. 2. Complexo vitamínico B. 3. Estado nutricional. 4. Ansiedade. 5. Depressão. I. Kac, Gilberto, orient. II. Título.

MÔNICA ARAUJO BATALHA

FATORES ASSOCIADOS ÀS CONCENTRAÇÕES DAS VITAMINAS DO COMPLEXO B E COLINA NO LEITE HUMANO: UM ESTUDO PROSPECTIVO NO RIO DE JANEIRO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para à obtenção do título de Doutora em Ciências Nutricionais.

Examinado por:

_____

Professora Dra. Juliana dos Santos Vaz

Faculdade de Nutrição/Universidade Federal de Pelotas-UFPEL

_____

Professora Dra. Elisa Lacerda

Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ

_____

Professora Dra. Fátima Sardinha

Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ

_____

Professora Dra. Patrícia Padilha

Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ

_____

Professora Dra. Tatiana El-Bacha Porto

Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ

_____

Professor Dr. Gilberto Kac

Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ**(Orientador)**

Dedicatória

Dedico esta tese à minha família, especialmente aos mais velhos que não tiveram as mesmas oportunidades que eu; ao meu avô João Araujo (in memoriam), pelos importantes ensinamentos deste último ano; aos meus pais Maria de Fátima Araujo Batalha e Raimundo Nonato Batalha e minha irmã Juliana Batalha, pelo amor, incentivo e doação sem medidas.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por me fortalecer e guiar ao longo desta jornada e pelos presentes que ganhei em forma de pessoas.

Aos meus pais, Maria de Fátima Araujo Batalha e Raimundo Nonato Batalha, pelo amor, priorização de minha educação e garantia de apoio e incentivo em todas as minhas decisões. Meus pais sempre me deram além do que eu necessitei, então, tudo o que eu conseguisse escrever aqui seria pequeno comparado ao tamanho da minha gratidão!

À minha irmã, Juliana Batalha, pela preocupação e por toda a ajuda desde minha mudança para o Rio de Janeiro até a finalização desta tese. Agradeço, principalmente, por renunciar a alguns de seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus e por todo cuidado dedicado aos nossos pais na minha ausência. Obrigada por ser muito mais evoluída do que eu e por sempre me lembrar que títulos não representam nada perto do que realmente é importante.

À minha família ludovicense, representada principalmente por minhas avós, tias e primas, pela preocupação e "torcida organizada" pelo meu sucesso. Ao meu avô, João Pinheiro de Araujo (*in memoriam*), por ter me ensinado tanto sobre o ser humano, força e amor, principalmente, neste último ano. Seu amor vive dentro de mim, Bobzinho!

À minha família carioca, pelos momentos de confraternização que amenizaram minha saudade de São Luís.

Às minhas amigas Amália Bastos e Jéssica Moraes que me esperavam em SP, mas apoiaram minha decisão de ir para o RJ. Obrigada por se fazerem presente, mesmo com a distância física, e por compartilharem comigo os dramas e alegrias desta vida acadêmica.

Às minhas amigas de infância, Taísa Serra e Ludmila Araujo, pela amizade de longa data e torcida à distância. A todos os meus amigos ludovicenses, especialmente os provenientes da escola e da Universidade Federal do Maranhão.

Às minhas amigas "retirantes", Nadyta e Lores, pelos ensinamentos, apoio, preocupação e, principalmente, por me receberem em suas casas inúmeras vezes, tornando os finais de semana mais animados e saborosos. Obrigada por aturarem minha teimosia, pelas turistadas e inúmeros

momentos de alegria. Hoje, entendemos que a ligação entre o Pará e o Maranhão vai além das divisas geográficas! Agradeço também à Liss, que chegou depois, mas cuja identificação foi imediata, por compartilhar comigo a importância dada ao cuscuz (rs) e às nossas raízes nordestinas.

À minha companheira de doutorado Amandinha Figueiredo, por ser sempre tão acolhedora e disponível, pela amizade construída, pela preocupação constante e por toda a diversão ao longo destes quatro anos. Obrigada por ter tornado a caminhada na pós-graduação mais leve e divertida!

Aos integrantes dos projetos Microbiota e Curvas, representados por Lores, Nath, Day e Thaís e muitos outros que passaram, com os quais tive uma convivência mais intensa nestes anos. Obrigada por todo aprendizado, parceria e diversão ao longo destes anos!

A todos os alunos e profissionais que passaram pelo Observatório de Epidemiologia Nutricional ao longo destes anos, por terem compartilhado um pouco de suas vidas, experiências e conhecimentos e por tornarem o dia a dia no Fundão mais divertido. As nossas comemorações com o bolo da Lores fazem muita falta! Já que o grupo ficou muito grande, eu me abstenho de citar nomes para evitar o risco de esquecer alguém.

Ao professor Gilberto Kac, por todas as orientações destinadas a este trabalho, pela compreensão nos momentos em que eu não pude me dedicar a esta tese e pelas oportunidades concedidas ao longo destes anos. Pude vivenciar todas as etapas necessárias para minha formação como pesquisadora em seu grupo, desde a colaboração na escrita de importantes projetos de pesquisa, como o ENANI e as Curvas, toda a coleta de dados do projeto Microbiota, o duro processo de limpeza dos bancos de dados no projeto da Curvas, até a participação na formação do Consórcio Brasileiro de Nutrição Materno-infantil. Sou grata por estas e outras oportunidades!

Ao professor Antônio Augusto Moura da Silva, por ter sido um verdadeiro mentor a partir do mestrado. Muitas vezes um aluno jovem, precisa apenas que alguém mais experiente conceda um pouco do seu tempo. Sou muito grata por ter tido este tempo e a atenção de alguém que sempre foi e será inspiração como profissional e pessoa e, a partir destas conversas, ter trilhado meu caminho para o doutorado. Obrigada pela disponibilidade e por sempre me incentivar!

Ao professor Rafael Pérez-Escamilla, pela cuidadosa recepção na *Yale University*, pelas importantes contribuições ao trabalho e por ter demonstrado, mesmo em pouco tempo de convivência, sua grandiosidade humana e profissional.

Às professoras Flávia Fioruci Bezerra e Elisa Lacerda pelas importantes contribuições na qualificação desta tese. Agradeço também à professora Flávia Fioruci por ter gentilmente destinado seu tempo para revisão deste material. Agradeço às professoras Elisa Lacerda, Fátima Sardinha, Juliana Vaz, Patrícia Padilha e Tatiana El-Bacha por terem aceitado cordialmente participar da avaliação deste trabalho.

A todos os funcionários, professores e alunos do Instituto de Nutrição Josué de Castro e do programa de pós-graduação em Nutrição da UFRJ, por todos os ensinamentos ao longo deste período.

A todos os professores que passaram pela minha vida e deixaram um pouco de si.

À CAPES, por ter financiado minha bolsa durante o doutorado e o período sanduíche no exterior.

As todas as gestantes/lactantes e aos funcionários da Clínica da Família escolhida para realização do projeto que deu origem a esta tese.

Muitas pessoas contribuíram para o início e finalização deste ciclo, portanto, agradeço a todos pelo apoio e torcida!

Mônica Araujo Batalha

Epígrafe

"Uma coisa que aprendi ao longo de minha vida: a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e infantil – e, mesmo assim, é a coisa mais preciosa que temos".

(Albert Einstein)

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação do aleitamento materno. 28
Quadro 2. Prevalência de indicadores de aleitamento materno entre 1986 e 2019 no Brasil. 29
Quadro 3. Fontes dietéticas de vitaminas do complexo B. 33
Quadro 4. Resumo das características das vitaminas do complexo B no leite humano. 35
Quadro 5. Principais resultados dos estudos que avaliaram a associação entre a ingestão dietética e as concentrações das vitaminas do complexo B no leite humano. 41
Quadro 6. Recomendações de ingestão dietética de vitaminas do complexo B durante a gestação e lactação. 66
Quadro 7. Métodos para avaliação das vitaminas do complexo B e colina no leite humano. 68
Quadro 8. Definição de aleitamento materno exclusivo e predominante. 70

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1. Características das mulheres com amostra de leite humano acompanhadas em uma coorte brasileira, Rio de Janeiro, Brasil (n=100)

Characteristics of women with human milk samples followed in the Brazilian cohort, Rio de Janeiro, Brazil. (n=100)..... 95

Tabela 2. Ingestão dietética materna e prevalência de inadequação durante a gestação e lactação

Maternal dietary intake and prevalence of inadequacy during pregnancy and lactation. 97

Tabela 3. Concentrações das vitaminas do complexo B e colina no leite humano em cada visita do pós-parto

B-vitamin and choline concentrations in milk at each postpartum visit. 99

Tabela Suplementar 1. Características na linha de base das mulheres acompanhadas em uma coorte brasileira, Rio de Janeiro, Brasil

Baseline characteristics of women followed in the Brazilian cohort, Rio de Janeiro, Brazil..... 109

Tabela Suplementar 2. Modelos de predição longitudinal das trajetórias das vitaminas do complexo B e colina no leite baseado nas suas concentrações aos 2-8 dias pós-parto

Models of longitudinal prediction of milk B-vitamin and choline trajectories based on their concentrations at 2-8 postpartum days. 111

Tabela Suplementar 3. Modelos de predição longitudinal das trajetórias das vitaminas do complexo B e colina no leite baseado no IMC materno pré-gestacional

Models of longitudinal prediction of milk B-vitamin and choline trajectories based on maternal prepregnancy BMI...... 112

Tabela Suplementar 4. Modelos de predição longitudinal das trajetórias das vitaminas do complexo B e colina no leite baseado na ingestão materna durante a gestação

Models of longitudinal prediction of milk B-vitamin and choline trajectories based on maternal intake during pregnancy...... 113

Tabela Suplementar 5. Modelos de predição longitudinal das trajetórias das vitaminas do complexo B e colina no leite baseado na ingestão materna durante a lactação

Models of longitudinal prediction of milk B-vitamin and choline trajectories based on maternal intake during lactation. 114

Tabela Suplementar 6. Modelos de predição longitudinal das trajetórias das vitaminas do complexo B e colina no leite baseado na idade gestacional ao nascimento

Models of longitudinal prediction of milk B-vitamin and choline trajectories based on gestational age at birth. 115

Artigo 2

Tabela 1. Características, biomarcadores e concentrações no leite humano das participantes

Characteristics, biomarkers, and human milk concentrations of participants. 139

Tabela 2. Associação entre saúde mental materna no terceiro trimestre gestacional e concentrações sérica de B-12 e homocisteína no pós-parto

Association between maternal mental health at 3rd trimester of pregnancy and postpartum serum concentrations of B-12 and homocysteine. 142

Tabela 3. Associação entre saúde mental materna no terceiro trimestre gestacional e aos 28-50 dias pós-parto e concentrações de B-12 no leite

Association between maternal mental health at 3rd trimester of pregnancy and at 28-50 postpartum days and B-12 milk concentrations. 143

Tabela Suplementar 1. Características na linha de base das mulheres acompanhadas em uma coorte brasileira

Baseline characteristics of women followed in the Brazilian cohort. 146

Tabela Suplementar 2. Associação entre concentrações séricas de B-12 e homocisteína no terceiro trimestre gestacional e saúde mental materna no pós-parto

Association between serum concentrations of B-12 and homocysteine at 3rd trimester of pregnancy and postpartum maternal mental health..... 147

Tabela Suplementar 3. Concentrações medianas de B-12 no leite humano de acordo com o estado de saúde mental materno

B-12 milk medians concentrations according to the maternal mental health status..... 148

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo da homocisteína. 50
Figura 2. Fluxograma da coorte e informações coletadas em cada entrevista. 58
Figura 3. Fluxograma do recrutamento e seleção das participantes incluídas no artigo 1. 60
Figura 4. Fluxograma do recrutamento e seleção das participantes incluídas no artigo 2. 61

Artigo 1

Figura 1. Fluxograma da amostra final das análises das vitaminas do complexo B e colina do leite humano durante a lactação de mulheres acompanhadas em uma coorte brasileira, Rio de Janeiro, Brasil
Flow diagram of the final samples for the analysis of B vitamins and choline in milk during lactation of women followed on Brazilian cohort, Rio de Janeiro, Brazil. 100
Figura 2. Predições longitudinais das concentrações das vitaminas do complexo B e colina no leite de acordo com as concentrações destes micronutrientes aos 2-8 dias pós-parto
Longitudinal predictions of B-vitamin and choline milk concentrations according to these micronutrients' concentration at 2-8 days. 101
Figura 3. Predições longitudinais das concentrações das vitaminas do complexo B e colina no leite de acordo com o IMC pré-gestacional
Longitudinal predictions of B-vitamin and choline milk concentrations according to prepregnancy BMI. 103
Figura 4. Predições longitudinais das concentrações das vitaminas do complexo B e colina no leite de acordo com as recomendações dietéticas para cada micronutriente durante a gestação
Longitudinal predictions of B-vitamin and choline milk concentrations according to each micronutrient's recommendations during pregnancy. 105
Figura 5. Predições longitudinais das concentrações das vitaminas do complexo B e colina no leite de acordo com as recomendações para cada micronutriente durante a lactação
Longitudinal predictions of B-vitamin and choline milk concentrations according to each micronutrient's recommendations during lactation. 107
Figura Suplementar 1. Concentrações de vitaminas do complexo B e colina no leite humano
B-vitamin and choline concentrations in human milk…….....117

Figura Suplementar 2. Correlação de Spearman entre as concentrações das vitaminas do complexo B e colina no leite humano e o IMC materno e a ingestão de alimentos de origem animal durante a gestação e lactação

Spearman correlation of B-vitamin and choline concentrations in the human milk and maternal BMI and ASF intake during pregnancy and lactation...... 119

Figura Suplementar 3. Predições longitudinais das concentrações das vitaminas do complexo B e colina no leite de acordo com os dias pós-parto

Longitudinal predictions of milk B-vitamin and choline concentrations according to postpartum days...... 120

Artigo 2

Figura 1. Medianas das concentrações de B-12 no leite de acordo com estado de saúde mental materno

B-12 milk medians concentrations according to the maternal mental health status..... 144

Supplemental Figure 1. Fluxograma de mulheres com amostra de leite humano e informação de saúde mental acompanhadas em uma coorte brasileira

Flow diagram of women with human milk samples and mental health information followed on Brazilian cohort...... 149

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Questionários e Protocolo de coleta de leite humano. 174
ANEXO 2. Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa - Secretaria Municipal de Saúde e defesa civil do Rio de Janeiro. 175
ANEXO 3. Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa - Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 176
ANEXO 4. Termo de consentimento livre e esclarecido. 183
ANEXO 5. Artigo 1. Factors associated with longitudinal changes in B-vitamin and choline concentrations of human milk. 185
ANEXO 6. Scripts das análises estatísticas-Artigo 1 186
ANEXO 7. Scripts das análises estatísticas-Artigo 2 211

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

95% CI	*95% Confidence Intervals*
AI	*Adequate Intake*
AM	Aleitamento Materno
AME	Aleitamento Materno Exclusivo
ASF	*Animal-source food*
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
D	Dias
DCNT	Doenças crônicas não-transmissíveis
EP	Erro-padrão
EPDS	*Edinburg Postnatal Depressive Scale*
EPDS	Escala de Depressão Pós-Parto de Edimburgo
FAD	*Flavin Adenine Dinucleotide*
FAPERJ	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
FFQ	*Food Frequency Questionnaire*
FMN	*Flavin mononucleotide*
g	Grama
H-AR	*Harmonized Average Requirement*
HPLC-FLD	*High-Performance Liquid Chromatography Fluorescence Detection*
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC 95%	Intervalo de Confiança de 95%
IDATE	Inventário de Ansiedade Traço-Estado
IMC	Índice de massa corporal
INJC	Instituto de Nutrição Josué de Castro
IOM	*Institute of Medicine*
IQR	*Interquartile range*
kg	Quilograma
LH	Leite Humano
m	Metros

Md	Mediana
mL	Mililitro
mg	Miligrama
µg	Micrograma
mo	*Months*
NAD	*Nicotinamide adenine dinucleotideo*
OMS	Organização Mundial de Saúde
POF	Pesquisa de Orçamento Familiar
PRONEX	Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência
QFA	Questionário de Frequência Alimentar
RBLH	Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano
REDCap	*Research Eletronic Data Capture*
RDA	*Recommended Dietary Allowances*
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SD	*Standard Deviations*
SE	*Standard Error*
SG	Semanas Gestacionais
STAI	*State-Trait Anxiety Inventory*
SUS	Sistema Único de Saúde
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TP	*Time point*
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UPLCMS/MS	*Ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry*
USDA	*United States Department of Agriculture*
WHO	*World Health Organization*

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO 19
RESUMO 21
ABSTRACT 23
1 INTRODUÇÃO 25
2 REFERENCIAL TEÓRICO 27
2.1 Aleitamento materno 27
2.2 Composição do leite humano 30
2.3 Aspectos gerais das vitaminas do complexo B e colina 32
2.4 Vitaminas do complexo B e colina no leite humano 34
2.5 Fatores que alteram a composição do leite humano 38
2.5.1 Ingestão dietética materna 39
2.5.2 Indicadores antropométricos maternos 46
2.6 Saúde mental materna 46
2.6.1 Saúde mental materna e vitaminas do complexo B 49
2.6.2 Saúde mental materna e composição do leite humano 52
3 JUSTIFICATIVA 54
4 HIPÓTESES 55
5 OBJETIVOS 56
5.1 Objetivo geral 56
5.2 Objetivos específicos 56
6 MÉTODOS 57
6.1 Delineamento, local e população-alvo do estudo 57
6.2 Participantes 59
6.2.1 Critérios de elegibilidade 59
6.2.2 Critérios de exclusão 59
6.2.3 Captação das participantes 59
6.3 Procedimentos de coleta de dados e amostras biológicas 62
6.3.1 Coleta e entrada de dados 62

6.3.2 Antropometria materna 62
6.3.3 Sintomas depressivos e de ansiedade 62
6.3.4 Concentrações séricas de vitamina B-12 e homocisteína 63
6.3.5 Consumo alimentar materno 64
6.3.6 Coleta de leite humano 66
6.3.7 Análise das vitaminas do complexo B no LH 67
6.4 Procedimentos de controle de qualidade dos dados 69
6.5 Covariáveis 70
6.6 Análise estatística 71
6.7 Aspectos éticos 74
7 RESULTADOS 75
7.1 Artigo 1 75
7.2 Artigo 2 122
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS 150
REFERÊNCIAS 153
ANEXOS 174

APRESENTAÇÃO

Esta tese faz parte de um estudo de coorte maior intitulado “Compostos bioativos do leite humano e associação com a saúde materna e o desenvolvimento infantil”. Trata-se de uma coorte prospectiva de acompanhamento de gestantes e seus filhos, com início no terceiro trimestre da gestação (entre 28ª e 35ª semanas gestacionais - SG) e acompanhamento até o primeiro ano de vida da criança. A coleta de dados foi realizada entre 2017 e 2020, em uma Clínica da Família, localizada na zona norte do Rio de Janeiro.

O estudo de coorte foi financiado pelo edital 46/2014 do Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX) da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo edital 01/2016 da chamada Universal do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela chamada 12/2017 de Bolsa de Produtividade em Pesquisa (PQ) do CNPq e pelo edital 02/2017 do Programa Cientista do Nosso Estado da FAPERJ. A doutoranda recebeu bolsa de estudos financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para participação em todas as etapas da coleta deste estudo e elaboração desta tese.

Os dados utilizados nesta tese foram coletados por pesquisadores do Observatório de Epidemiologia Nutricional, do Instituto de Nutrição Josué de Castro (INJC), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As concentrações das vitaminas do complexo B e colina do leite humano foram analisadas pela pesquisadora Daniela Hampel, com apoio de recursos financeiros provenientes da Fundação Bill e Melinda Gates, no laboratório coordenado pela professora Lindsay Allen, no *Western Human Nutrition Research Center (United States Development Agency-USDA*), em Davis, Califórnia, EUA. A aluna realizou período sanduíche na escola de Saúde Pública da Universidade de Yale, durante os meses de fevereiro e março de 2020, sob a supervisão do professor Rafael Pérez-Escamilla. O período sanduíche foi viabilizado pelo Programa Institucional de Internacionalização (Print), financiado pela CAPES.

A tese foi estruturada nas seguintes seções: resumo/*abstract*, introdução, referencial teórico, justificativa, hipóteses, objetivos (geral e específicos), métodos, resultados, considerações finais, referências e anexos.

A seção de resultados/discussão foi apresentada no formato de dois artigos científicos. O primeiro artigo já foi aprovado e publicado na revista *The American Journal of Clinical Nutrition*, porém, devido aos direitos autorais desta revista, apenas a primeira página da publicação está disponível em anexo. O segundo manuscrito está em fase de finalização para submissão na revista *The Journal of Nutrition*.

Os manuscritos foram elaborados no formato exigido pelas revistas. As referências da tese obedecem ao estilo da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Devido ao grande número de páginas dos questionários utilizados na coleta de dados, optou-se por disponibilizar tais documentos de forma online.

RESUMO

BATALHA, Mônica Araujo. **Fatores associados às concentrações das vitaminas do complexo B e colina no leite humano: um estudo prospectivo no Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 2021. Tese (Doutorado em Ciências Nutricionais) - Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021

Introdução: Pouco se sabe sobre como características maternas e as concentrações das vitaminas do complexo B e colina do leite humano (LH) nos primeiros dias pós-parto podem estar relacionadas às mudanças de suas concentrações ao longo da lactação. Paralelamente, existe evidência limitada sobre a relação de alterações na saúde mental materna e o estado nutricional materno de vitamina B12, e, até o momento, não existe evidência sobre como tais fatores podem alterar as concentrações de B-12 no LH. **Objetivo:** Avaliar fatores associados às trajetórias das concentrações das vitaminas do complexo B e colina no LH e investigar associação entre sintomas depressivos e de ansiedade, estado nutricional materno de vitamina B-12 e concentrações de B-12 no LH. **Métodos:** Coorte prospectiva com linha de base entre 28ª e 35ª semanas gestacionais e com amostras de LH coletadas em pelo menos uma das três entrevistas: 2-8 (1), 28-50 (2) e 88-119 (3) dias pós-parto. Modelos lineares longitudinais de efeitos mistos com termos de interação foram usados para avaliar as mudanças nas concentrações das vitaminas do complexo B e colina do LH ao longo do tempo. Modelos de regressão linear foram usados para avaliar a associação entre saúde mental materna e concentrações séricas de vitamina B-12 e de homocisteína; e a associação entre saúde mental materna e concentrações de B-12 no LH. **Resultados:** Participantes com maiores concentrações de niacina, ácido pantotênico, vitamina B-12 e colina nos primeiros dias de lactação (2-8 dias pós-parto) apresentaram menores concentrações destes micronutrientes ao longo da lactação. As participantes com sobrepeso e obesidade pré-gestacional apresentaram maiores concentrações de B-12 no LH ao longo do tempo quando comparadas com as participantes com baixo peso e eutrofia. Em contraste, menores concentrações de B-12 no LH foram observadas entre as mulheres com ingestão de B-12 abaixo da ingestão dietética diária recomendada (RDA) durante a gestação. As mulheres com ingestão de niacina abaixo da RDA durante a lactação experimentaram um aumento nas concentrações desta vitamina no LH ao longo do tempo. Participantes com idade gestacional no parto >40 semanas apresentaram maior concentração de

colina no LH ao longo da lactação. O aumento no escore de ansiedade na linha de base foi associado às maiores concentrações de homocisteína sérica maternas e menores concentrações de B-12 no LH na entrevista 2. **Conclusões:** As concentrações dos micronutrientes do LH nos primeiros dias pós-parto, o IMC pré-gestacional, a ingestão alimentar na gestação e lactação e a idade gestacional no parto podem estar associados às mudanças nas trajetórias dos micronutrientes do LH. Adicionalmente, sintomas de ansiedade materna, no final gestação, podem estar associados às concentrações séricas maternas de homocisteína e de B-12 no LH no primeiro mês pós-parto.

Palavras-chave: Gravidez; Lactação; Leite humano; Complexo Vitamínico B; Colina; Estado Nutricional; Depressão; Ansiedade.

ABSTRACT

BATALHA, Mônica Araujo. **Factors associated with B vitamins and choline milk concentrations: a prospective study in Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 2021. Tese (PhD degree in Nutrition Science) - Josué de Castro Institute of Nutrition, Federal University Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021

Background: Little is known regarding how maternal characteristics and milk B-vitamin and choline concentrations in the first postpartum days could be related to changes in their concentrations throughout lactation. Additionally, there is still limited evidence on the relationship between maternal mental health and maternal vitamin B-12 status, and, to our knowledge, no study investigated how these factors could be related to milk B-12 concentrations. **Objective:** To evaluate factors associated with the trajectories of B-vitamin and choline concentrations in human milk and to assess the association between depressive and anxiety symptoms, maternal nutritional status of vitamin B-12 and B-12 milk concentration. **Methods:** Prospective cohort with baseline between 28th and 35th gestational weeks and milk samples collected at least one of several time point (TP) follow-up visits at: 2-8 (TP1), 28-50 (TP2), and 88-119 (TP3) days postpartum. Longitudinal linear mixed-effects models with interaction terms were used to evaluate changes in B-vitamin and choline concentrations in milk over time. Linear regression analyses assessed the association of maternal mental health and serum B-12 and homocysteine concentration; and the association between maternal mental health and B-12 milk concentrations. **Results:** The women with higher early postpartum milk concentrations of niacin, pantothenic acid, B-12, and choline exhibited a decrease in their concentrations throughout lactation. The participants with overweight and obesity prepregnancy experienced an increase in milk B-12 concentrations over time. In contrast, a decrease in B-12 concentration was observed among women with B-12 intake below the recommended daily allowance (RDA) during pregnancy. The women with niacin intake below the RDA during lactation experienced an increase in milk concentrations over time. A gestational age at birth >40 weeks was associated with an increase in milk choline concentration throughout lactation. Each unit higher in anxiety state score at baseline were associated with higher serum homocysteine concentrations, and lower milk B-12 concentration at TP2. **Conclusions:** Early days concentrations of milk micronutrients, maternal prepregnancy BMI, dietary intake during

pregnancy and lactation, gestational age at delivery could be associated with changes in trajectories of B-vitamin and choline milk concentrations during lactation. Maternal anxiety in the end of pregnancy could be associated with maternal serum homocysteine concentrations and B-12 milk concentrations.

Keywords: Pregnancy, Lactation, Human milk, B vitamin, Choline, Nutritional Status, Depression, Anxiety.

1 INTRODUÇÃO

Há um crescente interesse pelo entendimento da composição do leite humano (LH), considerando a recomendação referente ao aleitamento materno exclusivo (AME) até o 6º mês de vida, proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), e tendo em vista que o LH deveria ser a única fonte de nutrientes para muitas crianças nestes primeiros meses de vida (CASAVALE et al., 2019; PÉREZ-ESCAMILLA et al., 2019; RASMUSSEN, 2019).

Os benefícios da amamentação para o grupo materno-infantil são inúmeros e estão bem descritos na literatura (DIETERICH et al., 2013; CHOWDHURY et al., 2015; VICTORA et al., 2016). Esses benefícios podem ser explicados por diversos mecanismos e, atualmente, um dos mais estudados é referente a composição do LH. Os macronutrientes, micronutrientes, células, bactérias e compostos bioativos do LH têm sido investigados no que diz respeito a este papel protetor (ANDREAS; KAMPMANN; LE-DOARE, 2015; PRENTICE et al., 2016; DONOVAN, 2019).

As vitaminas do complexo B e colina são classificadas como micronutrientes pertencentes ao grupo I do LH, de grande relevância para saúde pública, visto que são diretamente impactados pelo estado nutricional materno (ALLEN, 1994a). Estes micronutrientes agem como cofatores e coenzimas em várias reações metabólicas, incluindo aquelas que envolvem transferência de unidade de carbono, sendo necessárias para a saúde e o desenvolvimento infantil (BLACK, 2008; ZEMPLENI et al., 2013; KENNEDY, 2016; VENKATRAMANAN et al., 2016).

As concentrações das vitaminas do complexo B e colina no LH variam ao longo da lactação. Algumas aumentam, enquanto outras diminuem ou permanecem estáveis, e para algumas, a concentração pode aumentar em alguns períodos, mas diminuir durante outros (DROR; ALLEN, 2018). O estado nutricional materno, avaliado por meio de marcadores bioquímicos, dieta e ingestão de suplementos, tem sido investigado em relação às concentrações de vitaminas do complexo B e colina no LH (DANIELS et al., 2019; DONOHUE et al., 2020; GIBSON et al., 2020). Entretanto, ainda existem lacunas sobre como fatores maternos estariam associados às mudanças nas trajetórias das concentrações destas vitaminas ao longo da lactação.

Paralelamente, evidências sugerem o envolvimento das vitaminas do complexo B que participam das reações de transferência de uma unidade de carbono, principalmente B-12 e folato,

na ocorrência de alterações da saúde mental, incluindo sintomas de ansiedade e depressão (TIEMEIER et al., 2002; MIKKELSEN et al., 2016). Tal fato é relevante, principalmente, considerando que o período perinatal é caracterizado por elevadas prevalências de alterações na saúde mental (HOWARD et al., 2014; HOWARD et al., 2020).

Por um lado, as deficiências destes micronutrientes podem resultar em alterações nas concentrações de homocisteína e, consequentemente, serem relacionadas com sintomas de ansiedade e depressão (FOLSTEIN et al., 2007; MORADI et al., 2021). Por outro lado, a presença de alteração na saúde mental pode representar um risco para deficiência destes nutrientes, ao promover mudanças no comportamento e estilo de vida não saudável (BARKER et al., 2013; SAEED et al., 2015; BOUTTÉ et al., 2021). Alguns estudos investigaram a relação entre a ocorrência de sintomas de ansiedade e depressão perinatal e alterações na composição do LH (DI BENEDETTO et al., 2020). Porém, pouco se sabe sobre como alterações na saúde mental perinatal podem gerar deficiências maternas, especialmente de vitamina B-12, e impactar nas concentrações desta vitamina no LH.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aleitamento materno

O LH é considerado o alimento preferencial para alimentação das crianças nos seus primeiros seis meses de vida (WALKER et al., 2010; KRAMER; KAKUMA, 2012; VICTORA et al., 2016). O aleitamento materno (AM) é incentivado tanto por organizações quanto por profissionais de saúde por possuir benefícios nutricionais, psicológicos, econômicos e imunológicos (DIAS; FIGUEIREDO, 2015; HANSEN, 2016; VICTORA et al., 2016; PÉREZ-ESCAMILLA et al., 2019; WALTERS; PHAN; MATHISEN, 2019).

O AM é fundamental para o adequado crescimento e desenvolvimento infantil e contribui para a redução da mortalidade por infecções, diabetes mellitus tipo 2, para maiores escores de inteligência e para proteção contra sobrepeso e obesidade na adolescência e idade adulta (HORTA; LORET DE MOLA; VICTORA, 2015a; HORTA; LORET DE MOLA; VICTORA, 2015b; SMITHERS; KRAMER; LYNCH, 2015; VICTORA et al., 2016). Os benefícios do AM para a mãe incluem prevenção do câncer de mama, menor risco de diabetes mellitus tipo 2 e câncer de ovário (VICTORA et al., 2016), além de contribuir para redução da retenção de peso no pós-parto (KAC et al., 2004). A regulação hormonal (HANDLIN et al., 2009; NEELON et al., 2015), alterações vasculares (como redução da espessura e lúmen arterial) (GUNDERSON et al., 2015) e melhorias no metabolismo da glicose materno (MCMANUS et al., 2001; YASUHI et al., 2017), além da composição do próprio LH (DAVIS et al., 2017; BOIX-AMOROS et al., 2019; MAZZOCCHI et al.,2019; BINIA et al., 2021) estão entre alguns dos mecanismos que explicam o papel protetor do LH.

No que diz respeito à composição, o LH não é fonte apenas de nutrientes considerados essenciais, mas também de importantes compostos bioativos (DONOVAN et al., 2019). Existem inúmeras evidências sobre o papel protetor desempenhado pelos macronutrientes e micronutrientes e pelos compostos bioativos, como imunoglobulinas, hormônios e oligossacarídeos (ANDREAS; KAMPMANN; LE-DOARE, 2015; BALLARD; MORROW, 2013; DAVIS et al., 2017). As proteínas presentes no LH, por exemplo, servem como fonte de aminoácidos, melhoram a biodisponibilidade de micronutrientes, participam da defesa imunológica, da maturação intestinal, modulam a microbiota e têm papel na cognição (DONOVAN, 2019). Os oligossacarídeos têm sido relacionados à prevenção de infecções, ao influenciar a microbiota e a imunidade no início da vida

(SPRENGER; BINIA; AUSTIN, 2019).

A OMS recomenda o AME até o 6º mês de vida, desde 2001 (OMS, 2001). Nos meses subsequentes, e até o 2º ano de vida da criança, recomenda-se a amamentação complementada com outros alimentos (OMS/UNICEF, 2021). Esta recomendação é reforçada pelo "Guia Alimentar para crianças brasileiras menores de 2 anos" (BRASIL, 2019). O **Quadro 1** apresenta a classificação do AM segundo a recomendação do Ministério da Saúde (BRASIL, 2009).

Quadro 1. Classificação do aleitamento materno.

Tipos de Aleitamento Materno	**Definição**
Aleitamento materno exclusivo	Somente leite humano, direto da mama ou ordenhado, ou leite humano de outras fontes, sem outros líquidos ou sólidos, com exceção de gotas ou xaropes contendo vitaminas, sais de reidratação oral, suplementos minerais ou medicamentos
Aleitamento materno predominante	Além do leite humano, água ou outras bebidas à base de água (água adocicada, chás, infusões), sucos de frutas e fluídos rituais[1,2]
Aleitamento materno	Leite humano (direto da mama ou ordenhado), independente de receber outros alimentos
Aleitamento materno complementado	Além do leite humano, qualquer alimento sólido ou semissólido com a finalidade de complementá-lo, e não de substituí-lo. O recebimento de outro tipo de leite, como o leite de vaca, por exemplo, não é classificado como alimento complementar
Aleitamento materno misto ou parcial	Leite materno e outros tipos de leite

Fonte: Brasil (2009)
Notas:
[1]Fluídos rituais=líquidos ou misturas utilizadas em ritos místicos ou religiosos.
[2]A OMS não considera os fluídos rituais como pertencente ao grupo dos alimentos considerados como exceção para o AME. Por outro lado, o Ministério da Saúde apoia a inclusão destes alimentos na definição de AME, desde que utilizados em volumes reduzidos, de forma a não concorrer com o LH.

A promoção e proteção do AM é alvo de diversas políticas mundiais. Em 1991, foi lançada a "Iniciativa Hospital Amigo da Criança" que consiste em um programa para incentivar

maternidades em todo o mundo a adotar os “Dez Passos para o Sucesso do Aleitamento Materno” e, desta forma, melhorar as taxas de AM na primeira hora de vida, AME, AM predominante e qualquer tipo de AM (SINHA et al., 2015; PÉREZ-ESCAMILLA; MARTINEZ; SEGURA-PÉREZ, 2016).

Apesar das diversas evidências relacionadas aos benefícios do AME, as prevalências mundiais e nacionais ainda permanecem abaixo de 50% e de 70%, metas estabelecidas pela OMS para serem alcançadas até 2025 e 2030, respectivamente (VICTORA et al., 2016; OMS, 2017; NEVES et al., 2021). A prevalência de AME, em crianças menores de seis meses, nos países de baixa e média renda é de apenas 37%. A manutenção do AM até os 12 meses e 24 meses de idade da criança é mais comum nos países de baixa renda, nos quais as prevalências são maiores do que 90% e 60%, respectivamente. Nos países de alta renda, até os seis meses, as prevalências de AME e de qualquer tipo de AM foram de 18% e 45%, respectivamente; aos 12 meses, a mediana da prevalência de AM continuado foi de 29% (VAZ et al., 2021). No Brasil, as prevalências dos indicadores de AM foram obtidas a partir de inquéritos nacionais nos anos de 1986, 1996, 2006, 2013 e 2019. A prevalência de AME em menores de seis meses aumentou de 2,9% para 45,7%, entre os anos de 1986 e 2019 (**Quadro 2**).

Quadro 2. Prevalência de indicadores de aleitamento materno entre 1986 e 2019 no Brasil.

Indicador de AM	**Prevalência**				
	1986[1]	**1996**[2]	**2006**[3]	**2013**[4]	**2019**[5]
Aleitamento materno exclusivo em <6 meses	2,9	23,9	37,1	36,6	45,7
Aleitamento materno total em <2 anos	37,4	44,8	56,3	52,1	60,9
Aleitamento materno continuado com um ano	22,7	37,5	47,2	45,4	53,1
Aleitamento materno continuado aos dois anos	24,5	24,7	23,3	31,8	-

Fonte: Adaptado de Boccolini et al. (2017) e dos resultados preliminares ENANI-2019 (UFRJ, 2020).
Notas:
[1]Dados provenientes da Pesquisa Nacional sobre Saúde Materno-Infantil e Planejamento Familiar de 1986.
[2]Dados provenientes da Pesquisa Nacional sobre Demografia e Saúde de 1996.
[3]Dados provenientes da Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher.
[4]Dados provenientes da Pesquisa Nacional de Saúde de 2013.
[5]Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil-ENANI-2019 (UFRJ, 2020).

Os aumentos nas prevalências do AM estão relacionados às várias políticas de promoção e proteção ao AM, como o Programa Nacional de Aleitamento Materno, iniciadas a partir da década de 80 no Brasil (BOCCOLINI et al., 2017). Dentre as políticas nacionais, além da Iniciativa Hospital Amigos da Criança implementada em 1992, houve a criação de extensa Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano (RBLH), desde 1998 (BRASIL, 2006; MAIA et al., 2006), e a inclusão do direito a 120 dias de licença maternidade (180 dias, em caso de servidora pública), na Constituição Federal (BRASIL, 2008; MONTEIRO et al., 2019).

2.2 Composição do leite humano

O LH é considerado um fluido complexo, composto por inúmeros constituintes que podem ser categorizados de acordo com suas propriedades físicas ou fisiológicas em macronutrientes (proteínas, carboidratos e lipídeos), micronutrientes (vitaminas, minerais e elementos traços), células, bactérias e compostos bioativos (oligossacarídeos, hormônios, imunoglobulinas, citocinas, entre outros) (PICCIANO, 2001; BALLARD; MORROW, 2013; CHRISTIAN et al., 2021). As três fontes principais que dão origem aos componentes nutricionais do LH são a síntese nas células epiteliais, a dieta e as reservas maternas (BALLARD; MORROW, 2013; DE VRIES et al., 2018).

Evidências demonstram que a composição do LH é dinâmica, variável entre as mulheres, e pode ser modificada ao longo do período pós-parto, para atender as necessidades nutricionais e imunológicas da criança (BALLARD; MORROW, 2013; ANDREAS; KAMPMANN; LE-DOARE, 2015). De acordo com o estágio de lactação, o LH é classificado em colostro, leite de transição e leite maduro (JENNES, 1979).

O colostro é secretado nos primeiros dias pós-parto pela mãe, em pequenas quantidades, e é caracterizado pela quantidade elevada de componentes imunológicos e fatores de crescimento e baixa concentração de lactose e gordura (OKADA et al., 1991; SAITO et al., 1993; PANG et al., 2007; CASTELLOTE et al., 2011). No colostro, as concentrações de sódio, cloreto e magnésio são altas e as de cálcio e potássio são baixas quando comparadas com LH em estágios posteriores da lactação (KULSKI; HARTMANN, 1981; PANG; HARTMANN, 2007). O leite de transição é secretado pela mãe entre o 5º dia até a segunda semana pós-parto e possui algumas características do colostro. No entanto, a produção do leite de transição pela mulher tende a ser mais abundante, a fim de garantir e atender as necessidades nutricionais e de desenvolvimento, em uma fase de

rápido crescimento infantil (BALLARD; MORROW, 2013). O leite maduro é secretado após a segunda semana do pós-parto e é caracterizado por maiores concentrações de lipídeos e menores de fatores imunológicos, proteínas e lactose, que decrescem ao longo da lactação (KADER et al., 1972; BALLARD; MORROW, 2013).

Na mesma época em que a OMS divulgou as recomendações de AM foi lançado um documento de revisão sobre adequação de nutrientes (energia, proteína, cálcio, ferro, zinco e vitaminas A, D, B6) para crianças exclusivamente amamentadas até o 6º mês de vida, com a finalidade de fortalecer o papel protetor conferido pelo AME (ALLEN, 2012). Entretanto, dentre os nutrientes avaliados, este documento demonstrou que apenas as deficiências maternas das vitaminas A e B6 poderiam alterar as concentrações destas vitaminas no LH e, consequentemente, afetar a saúde da criança (BUTTE; LOPEZ-ALARCON; GARZA, 2002). Uma limitação é que esse documento não avaliou como a deficiência de outras vitaminas maternas poderia influenciar em suas respectivas concentrações no LH (ALLEN, 2012).

Erick (2018) sugeriu a utilização do termo “condicionalmente perfeito” para definir o LH, visto que sua composição pode ser condicionada, por exemplo, à dieta materna. Estudos sugerem que os nutrientes do LH podem ter suas concentrações influenciadas por diversos fatores maternos e infantis, sejam eles modificáveis ou não, o que torna difícil a avaliação desta composição. Adicionalmente, aspectos metodológicos, incluindo coleta, manuseio, armazenamento e pré-processamento das amostras também podem ter importantes impactos na composição do LH (BALLARD; MORROW, 2013; DROR; ALLEN, 2018; ERIKSEN et al., 2018; ALLEN; HAMPEL, 2019; CHRISTIAN et al., 2021).

A composição de macronutrientes do LH parece variar durante os estágios de lactação, conforme citado anteriormente, na própria lactante, de acordo com o volume de LH produzido e entre os diferentes estados nutricionais maternos (BALLARD; MORROW, 2013; LEGHI et al., 2020; DANIEL et al., 2021). Por outro lado, os micronutrientes do LH são classificados em dois grupos principais (ALLEN, 1994a). O grupo I é composto por aqueles cujas concentrações são afetadas rapidamente pela depleção das concentrações maternas, portanto, são considerados de maior interesse para a saúde pública. Neste grupo estão incluídas as vitaminas do complexo B, a vitamina A, a vitamina D, o selênio e o iodo. O grupo II é composto por nutrientes cujas

concentrações no LH são pouco ou não são afetadas pela ingestão dietética e estado nutricional materno. Nesse grupo estão incluídos o folato, cálcio, ferro e zinco (ALLEN, 1994a).

2.3 Aspectos gerais das vitaminas do complexo B e colina

As vitaminas são compostos orgânicos necessários para o crescimento e desenvolvimento saudável (KENNEDY, 2016). A atuação destas vitaminas varia desde cofatores para inúmeras enzimas até reguladores de expressão gênica e função antioxidante (DE VRIES et al., 2018).

As vitaminas do complexo B incluem a tiamina (ou vitamina B1), riboflavina (ou vitamina B2), niacina (ou vitamina B3), ácido pantotênico (ou vitamina B5), piridoxina (ou vitamina B6), biotina (ou vitamina B7), ácido fólico (ou vitamina B9), cobalamina (ou vitamina B12).

De forma geral, estas vitaminas não são sintetizadas no organismo, portanto, são fornecidas principalmente pela ingestão alimentar (KENNEDY, 2016). No entanto, evidências sugerem que estas vitaminas também podem ser sintetizadas em quantidades limitadas pela microbiota do trato gastrointestinal (MAGNÚSDÓTTIR et al., 2015). A niacina é uma das exceções a esta regra, pois pode ser sintetizada a partir do triptofano (KIRKLAND, 2014; MEYER-FICCA; KIRKLAND, 2016). A colina é um nutriente essencial, mas que pode ser produzido em pequenas quantidades no fígado (IOM,1998). As principais fontes de vitaminas do complexo B, exceto folato, e colina incluem os alimentos de origem animal conforme apresentados no **Quadro 3** (KENNEDY, 2016).

Estes micronutrientes participam de diversas vias metabólicas, como metabolismo dos carboidratos, dos aminoácidos e dos ácidos graxos, síntese de ácidos nucleicos e neurotransmissores, atuando de forma sinérgica em muitas destas vias (SECHI et al., 2016). A cobalamina, piridoxina, riboflavina, o folato e a colina atuam nas reações de transferência de uma unidade de carbono, de modo que, deficiências destes micronutrientes, assim como polimorfismos genéticos e fatores ambientais, alteram tal via metabólica e têm sido relacionadas aos eventos adversos de saúde, como doenças degenerativas, cardiovasculares, psiquiátricas e disfunções cognitivas (BOTTIGLIERI et al., 1996; ANDERSON et al., 2012, SECHI et al., 2016; MCNULTY et al., 2019). Evidências também sugerem que as deficiências desses nutrientes no período da gestação e lactação estejam relacionadas aos impactos na programação fetal intrauterina, nos desfechos gestacionais e na saúde e desenvolvimento cognitivo infantil (SINCLAIR et al., 2007; MURPHY et al., 2007; MOLLOY et al., 2008; CHRISTIAN; STEWART, 2010; BENTON, 2012;

STEEGERS-THEUNISSEN et al., 2013; RUSH; KATRE; YAJNIK, 2014; GERNAND et al., 2016; ALLEN et al., 2018; BALA et al., 2021; KORSMO; JIANG, 2021).

Quadro 3. Fontes dietéticas de vitaminas do complexo B e colina.

Vitaminas	Principais fontes dietéticas
Tiamina	Cereais (especialmente grãos integrais), vegetais verdes, batatas, macarrão, fígado, carne de porco, ovo
Riboflavina	Lacticínios, vegetais folhosos, legumes, fígado, rins, cogumelos
Niacina	Carne bovina, peixe, cereais integrais, legumes, cogumelos, oleaginosas
Ácido pantotênico	Carne bovina, cereais integrais, brócolis
Piridoxina	Carne bovina, peixe, legumes, oleaginosas, banana, batata
Biotina	Ovos, fígado, carne suína, folhas verdes
Folato/ ácido fólico	Folhas verdes, legumes e frutas cítricas
Cobalamina	Carne bovina, peixe e outros produtos de origem animal
Colina	Gérmen de trigo, carne bovina, ovos, leite de vaca e outros produtos de origem animal

Fonte: adaptado de Kennedy (2016)

As prevalências das deficiências desses micronutrientes na população não estão bem descritas na literatura, porém quatro grupos de risco têm sido mais estudados: idosos, indivíduos com insuficiência cardíaca, vegetarianos/veganos e indivíduos após cirurgia bariátrica (SECHI et al., 2016). Tais prevalências são ainda mais difíceis de serem quantificadas durante a gestação e lactação, visto que com as alterações fisiológicas e anatômicas destes períodos ocorrem mudanças no estado nutricional destas vitaminas, principalmente de cobalamina, devido à transferência para o feto e a criança (MURPHY et al., 2007). Ao longo da gestação é esperada uma queda nas concentrações séricas de cobalamina em torno de 25-30% (HURE et al., 2012; VISENTIN et al., 2016; BAE et al., 2015). No pós-parto, as concentrações de cobalamina podem ser maiores do que em mulheres não-gestantes, o que pode ser explicado por uma possível adaptação para transferência desta vitamina dos estoques maternos para a criança via LH (BAE et al., 2015).

2.4 Vitaminas do complexo B e colina no leite humano

As vitaminas do complexo B fazem parte do grupo I de micronutrientes do LH por serem diretamente influenciadas pelo estado nutricional e consumo materno. A única exceção é o folato. O estudo destas vitaminas no LH é de grande relevância para a saúde pública, principalmente em países com elevada prevalência de deficiência, visto que suas baixas concentrações no LH podem contribuir para o atraso no crescimento e impactos na saúde da criança no primeiro ano de vida (ALLEN et al., 2012; ALLEN et al., 2018).

Alguns estudos encontraram relação entre concentrações séricas, ingestão alimentar e/ou uso de suplementos maternos de vitaminas do complexo B e colina e as respectivas concentrações destes micronutrientes no LH (PRATT et al., 1951; WEST; KIRKSEY, 1976; PRENTICE et al., 1983; SONG et al., 1984; CHANG; KIRKSEY, 1990; SPECKER et al., 1990; KODENTSOVA; VRZHESINSKAYA, 2006, DAGNELIEL et al., 1992; ALLEN, 2012; GREIBE et al., 2013; NEUMANN et al., 2013; DUGGAN et al., 2014). O **Quadro 4** apresenta breve descrição de vitaminas do complexo B e colina presentes no LH.

Quadro 4. Resumo das características das vitaminas do complexo B e colina no leite humano[1].

Micronutrientes	**Formas no LH[1]**	**Concentrações no LH ao longo do período de lactação[1]**	**Fatores maternos associados às concentrações dos micronutrientes no LH[1]**			**Consequências da deficiência**	**AI[2]**
			Concentração sérica materna	**Dieta Materna**	**Uso de suplemento materno**		
Tiamina	Tiamina monofosfato, tiamina livre e tiamina trifosfato	Aumenta nos primeiros meses	Associação positiva	Associação positiva	Associação positiva	Beribéri, edema, fadiga, sintomas gastrointestinais, convulsões, disfunção auditiva, atrasos no desenvolvimento[3]	0,2 mg/d
Riboflavina	Flavina adenina dinucleotideo (FAD), riboflavina livre e outros derivados de flavina	Alcança o pico entre 2 a 4 meses e depois diminui. Alguns estudos observaram estabilidade nos três primeiros meses	Resultados conflitantes	Associação positiva	Associação positiva	Fraqueza, dermatite, anemia, fadiga, mudanças de personalidade, disfunções cerebrais[4]	0,3 mg/d

Micronutrientes	Formas no LH[1]	Concentrações no LH ao longo do período de lactação[1]	Fatores maternos associados às concentrações dos micronutrientes no LH[1]			Consequências da deficiência	AI[2]
			Concentração sérica materna	Dieta Materna	Uso de suplemento materno		
Niacina	Nicotinamida e suas formas coenzimáticas, a nicotinamida riboside e nicotinamida mononucleotideo	Aumenta nos primeiros meses	Pouca evidência	Associação positiva	Pouca evidência	Pelagra, depressão, ansiedade, vertigem, perda de memória, paranoia, sintomas psicóticos, agressividade[5]	2 mg/d
Ácido pantotênico	Ácido pantotênico	Aumenta nos primeiros meses	Pouca evidência	Associação positiva	Associação positiva	Dermatite, diarreia, dormência, mudanças no comportamento, encefalopatia, desmielinização[6]	1,7 mg/d
Piridoxina	Piridoxal, piridoxal fosfato, piridoxamina e piridoxina	Aumenta nas primeiras semanas pós-parto e depois diminui	Associação positiva	Associação positiva	Associação positiva	Anemia, alterações neurológicas e comportamentais, irritabilidade e convulsões. Atraso no crescimento e desenvolvimento[7]	0,1 mg/d

Micronutrientes	**Formas no LH[1]**	**Concentrações no LH ao longo do período de lactação[1]**	**Fatores maternos associados às concentrações dos micronutrientes no LH[1]**			**Consequências da deficiência**	**AI[2]**
			Concentração sérica materna	**Dieta materna**	**Uso de suplemento materno**		
Cobalamina	Metilcobalamina, 5'-de-oxyadenosylco-balamina, hidroxocobalamina e cyanocobalamina	Alta concentração no colostro diminui nas primeiras semanas do pós-parto e depois se estabiliza	Associação positiva	Associação positiva	Associação positiva	Anemia megaloblástica, alterações metabólicas e no comportamento[8], restrição no crescimento e no perímetro cefálico, atraso no desenvolvimento[1]	0,4 µg/d
Colina	Colina livre, fosfocolina e glicerofosfocolina	Aumenta de 7 a 22 dias pós-parto e depois permanece estável	Associação positiva	Associação positiva	Associação positiva	Atraso no desenvolvimento infantil[1]	125 mg/d

Notas:
[1]Adaptado de ALLEN; DROR (2018) e ALLEN; HAMPEL (2019).
[2]Valores de referência para crianças de 0-6 meses (IOM, 1988).
[3]BATES, 2007; MIMOUNI-BLOCH et al., 2014
[4]RIVLIN, 2007
[5]KIRKLAND, 2013
[6]RUCKER; BAUERLY, 2013
[7]DAKSHINAMURTI; DAKSHINAMURTI, 2013
[8]REYNOLDS, 2006; GREEN; MILLER, 2007
Abreviatura: AI: Ingestão Adequada (do inglês, *Adequate Intake*)

2.5 Fatores que alteram a composição do leite humano

A maior parte dos estudos sobre a composição do LH (ex. macronutrientes e micronutrientes) foi publicada até a década de noventa, devido ao pouco incentivo a esta temática (RASMUSSEN, 2019). Em geral, estes estudos foram desenvolvidos com pequenas amostras e possuem limitações metodológicas importantes (ALLEN; DROR, 2018; WU et al., 2018). Entretanto, nos últimos anos, os fatores que estariam relacionados às concentrações dos nutrientes do LH, e como concentrações inadequadas poderiam afetar a saúde da criança voltaram a ser tema de grande interesse das investigações científicas (ALLEN; DROR, 2018). O aumento do número de estudos com esta temática se justifica considerando as mudanças na alimentação materna e a escassez de dados sobre a ingestão de referência para crianças que recebem fórmulas infantis, visto que tais recomendações seriam baseadas na composição do LH (RASMUSSEN, 2019).

O LH deve ser entendido como um sistema biológico, em que fatores maternos, infantis e fisiológicos podem influenciar a sua composição (ANDREAS; KAMPMANN; LE-DOARE, 2015; HAMPEL et al., 2017; CHRISTIAN et al., 2021). As variações ao longo de um dia, durante a própria amamentação (leite anterior e posterior) e o estágio da lactação estão entre os fatores mais estudados (MITOULAS et al., 2002; KENT et al., 2006; CHANG et al., 2015; WU et al., 2018). Todavia, outros fatores como idade materna, paridade, idade gestacional no parto ainda são pouco estudados e o estado nutricional materno e a composição corporal ainda não têm seus efeitos bem estabelecidos (PRENTICE, 1996; BZIKOWSKA-JURA et al., 2018; DROR; ALLEN, 2018). Em uma revisão sistemática com meta-regressão recente, incluindo 66 estudos, com o objetivo de avaliar a relação entre o IMC materno e a composição de energia e macronutrientes do LH, foi observada associação positiva entre o IMC materno e a quantidade de gordura, mas não com a quantidade de proteína e energia do LH (DANIEL et al., 2021).

Allen e Hampel (2019) observaram que as concentrações de vitaminas hidrossolúveis no LH (vitaminas C e do complexo B) variam fisiologicamente ao longo do período de lactação e podem ser influenciadas pelo uso de suplemento dietético pela mãe. Adicionalmente, determinadas vitaminas deste grupo poderiam ser influenciadas pela paridade, nascimento pré-termo, tabagismo e doenças maternas, mas estes fatores ainda não foram adequadamente estudados e os resultados são muito conflitantes (ALLEN; HAMPEL, 2019).

Ren et al. (2015), em estudo com 1.778 amostras provenientes de um banco de LH, fornecidas por mulheres chinesas saudáveis em diferentes estágios de lactação, observaram variação nas concentrações de cinco vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico e piridoxina), de acordo com o estágio de lactação e a área geográfica do estudo. As concentrações das vitaminas foram mais baixas no colostro quando comparado ao leite de transição e o leite maduro. Os autores observaram que as concentrações foram mais baixas nas áreas rurais quando comparadas às áreas urbanas e mais altas nas áreas litorâneas quando comparadas às áreas não litorâneas (REN et al., 2015). Uma possível explicação dada pelos autores seria que alguns peixes e crustáceos, fontes de riboflavina e niacina, estariam mais disponíveis para as lactantes residentes nas áreas litorâneas, justificando as maiores concentrações no LH nestas áreas, entretanto, tal estudo não investigou a ingestão dietética das participantes. Adicionalmente, participantes com maior renda e escolaridade poderiam fazer melhores escolhas alimentares e, nesse estudo, essas participantes residiam nas áreas urbanas e litorâneas.

2.5.1 Ingestão dietética materna

Alguns estudos têm investigado a ingestão dietética materna e sua relação com as concentrações de ácidos graxos (TIAN et al., 2019), carotenoides (ZIELINSKA et al., 2019) e as vitaminas hidrossolúveis no LH (NEUMANN et al., 2013; ALLEN; HAMPEL, 2019; DANIELS et al., 2019). Entretanto, a relação entre a dieta insuficiente e/ou inadequação das concentrações séricas maternas e a deficiência de micronutrientes e outros compostos bioativos do LH ainda é pouco clara (LÖNNERDAL, 1986; CASAVALE et al., 2019), devido aos resultados conflitantes existentes.

As necessidades maternas de tiamina aumentam durante a gestação e lactação e no terceiro trimestre gestacional parece ser absorvida preferencialmente pelo feto (BUTTERWORTH, 2001). Somado a este fato, Ortega et al. (2004), em estudo realizado na Espanha, observaram que as participantes com ingestão de tiamina acima das recomendações dietéticas espanholas (mínimo de 1 mg/dia), no terceiro trimestre gestacional, apresentaram maiores concentrações de tiamina no LH maduro (~40 dias de lactação) quando comparadas às participantes com ingestão abaixo destas recomendações no mesmo período. Deste modo, uma deficiência clínica de tiamina no período gestacional poderia ter consequências em longo prazo para o funcionamento cognitivo infantil (BENTON, 2012).

A cobalamina consiste em excelente exemplo de como o estado nutricional pré e pós-natal são importantes. Em um estudo realizado com 183 lactantes na Guatemala, Deegan et al. (2011) observaram correlação positiva entre a ingestão dietética de cobalamina, obtida a partir de um questionário de frequência alimentar (QFA), e as concentrações desta vitamina no LH. Em mulheres saudáveis e com adequada ingestão de cobalamina durante a gestação, a criança nasce com uma reserva hepática de aproximadamente 25 µg que parece ser adequada para o primeiro ano de vida (VAZ-PINTO et al., 1975; ALLEN, 1994b). Entretanto, em situações de ingestão insuficiente de cobalamina durante a gestação, a criança parece nascer com uma reserva mais baixa e o fornecimento de cobalamina, proveniente do LH, é necessário para a manutenção do estado adequado desta vitamina no período de AME. No caso de deficiência materna pós-natal, é provável que a composição do LH seja inadequada para suprir as demandas da criança, especialmente aquelas que apresentarem reserva hepática inicial baixa, como consequência de uma deficiência pré-natal materna (ALLEN, 1994b).

Daniels et al. (2019), em um estudo transversal realizado na Indonésia com 113 lactantes e seus filhos, observaram uma associação positiva entre a ingestão dietética materna de niacina e riboflavina e as concentrações de nicotinamida e riboflavina livre no LH. Este mesmo estudo também avaliou a ingestão de outras vitaminas do complexo B (tiamina, ácido pantotênico, piridoxina e cobalamina) pelas lactantes e não encontrou associação destas vitaminas com suas respectivas concentrações no LH. Estes achados foram confirmados em um estudo realizado posteriormente, também na Indonésia, em que apenas o consumo materno de niacina foi associado às concentrações de niacina (sob forma de nicotinamida) do LH, no segundo mês pós-parto (GIBSON et al., 2020). Williams et al. (2016), em estudo realizado com 286 mulheres quenianas, não observaram relação entre as concentrações de cobalamina no LH e o escore de alimentos de origem animal ou ingestão de cobalamina dietética materna. O **Quadro 5** apresenta um resumo de alguns estudos que relacionaram ingestão dietética e as concentrações de vitaminas do complexo B e colina no LH.

Quadro 5. Principais resultados dos estudos que avaliaram a associação entre a ingestão dietética e as concentrações das vitaminas do complexo B no leite humano.

Autor (ano)	País	Amostra	Avaliação do consumo alimentar	Amostras dos micronutrientes do leite humano	Resultados
West & Kirksey (1976)	Estados Unidos	19	Registro alimentar (RA) de 3 dias consecutivos durante a 1ªsemana de coleta de leite.	**Amostra:** 3 dias consecutivos na 1ª semana e 1 dia em cada uma das 2 semanas seguintes. **Micronutriente no LH:** B6 **Estágios de lactação:** 3 semanas a 30 meses	Os indivíduos que consumiram <2,5 mg/dia de B6 tiveram menor média desta vitamina no LH (129 mg/L) do que os grupos que consumiram 2,5 a 5,0 mg/dia ou >5,0 mg/dia (239 e 314 mg/L).
Boylan et al. (2002)	Estados Unidos	25	1 Recordatório de 24 horas (R24h) no pós-parto	**Amostra:** 1 **Micronutriente no LH:** B6 **Estágios de lactação:** 8 a 11 dias após o parto	Mães com ingestão de B6 superior ao valor mediano de 2,9 mg/dia apresentaram concentração de B6 mais alta no LH (0,65 µmol/L) do que as mães com ingestão abaixo de 2,9 mg/dia (0,18 µmol/L).
Ortega et al. (2004)	Espanha	82	RA de 5 dias durante o 3º trimestre gestacional (entre 32ª e 36ª semana gestacional)	**Amostra de LH:** 1 **Micronutriente no LH:** tiamina **Estágios de lactação:** 13-14 dias (leite de transição, n=20) e 40 dias (leite maduro, n =21)	As concentrações de tiamina no LH maduro foram maiores nas gestantes com ingestão de tiamina acima das recomendações espanholas de no mínimo de 1 mg/d (0,59 µmol/L) do que naquelas com ingestões abaixo (0,25 µmol/L).

Autor (ano)	País	Amostra	Avaliação do consumo alimentar	Amostras dos micronutrientes do leite humano	Resultados
Fischer et al. (2010)	Estados Unidos	103	RA de 3 dias imediatamente antes da visita pós-parto de 45 dias	**Amostra de LH:** 1 **Micronutriente no LH:** colina **Estágios de lactação:** 45 dias após o parto	A ingestão de colina proveniente da dieta (sem uso de suplemento) não foi associada à concentração de colina no LH, exceto por uma associação com o metabólito fosfatidilcolina.
Deegan et al. (2012)	Guatemala	183	Questionário de frequência alimentar (QFA) aos 12 meses pós-parto	**Amostra de LH:** 1 **Micronutriente no LH:** B12 **Estágios de lactação:** 12 meses pós-parto	Correlação positiva entre a ingestão de B12 e as concentrações B12 no LH.
Neumann et al. (2013)	Quênia	98	Método de pesagem e R24h (2 dias consecutivos/mês).	**Amostra de LH:** 3 **Micronutriente no LH:** B12 **Estágios de lactação:** 1ª semana até 6º mês	A ingestão materna de B12 de 0-1 mês pós-parto não foi preditora de B12 no LH. Entretanto, a ingestão materna de B12 de 1 a 4 meses e de 4 a 6 meses pós-parto foi preditora de 20% e 26% da variação do teor de B12 no LH neste período, respectivamente.

Autor (ano)	País	Amostra	Avaliação do consumo alimentar	Amostras dos micronutrientes do leite humano	Resultados
Davenport et al. (2015)	Estados Unidos	28 lactantes (5 semanas pós-parto) e 21 não gestantes/ lactantes (controle)	Estudo controlado sobre alimentação (fornecida) em que lactantes e controle consumiram 480 ou 930 mg/dia de colina por 10 semanas (lactantes) ou 12 semanas (controle).	**Amostra de LH:** 2 **Micronutriente no LH:** colina **Estágios de lactação:** início (semana 0) e final (semana 10) do estudo	A ingestão materna de colina influenciou a composição da colina no LH com concentrações significativamente maiores de fosfocolina e glicerofosfocolina no grupo de 930 vs. 480mg de colina/dia.
Whitfield et al. (2016)	Camboja	90 (n=30, em cada grupo)	3 grupos de consumo de molho de peixe: controle (sem tiamina), baixa concentração (2 g/L) ou alta concentração (8 g/ L) de tiamina.	**Amostra de LH:** 1 **Micronutriente no LH:** tiamina **Estágios de lactação:** 3-28 semanas pós-parto	Mulheres que consumiram molho de peixe fortificado com tiamina apresentaram maiores concentrações de tiamina no LH comparadas ao grupo controle.
Williams et al. (2016)	Zona rural do Quênia	286	QFA e R24h	**Amostra de LH:** 1 **Micronutriente no LH:** B12 **Estágios de lactação:** 1-6 meses pós-parto	Não houve associação entre o escore de alimentos de origem animal ou ingestão de B12 nas 24h anteriores e B12 no LH.

Autor (ano)	País	Amostra	Avaliação do consumo alimentar	Amostras dos micronutrientes do leite humano	Resultados
Pawlak et al. (2018)	Estados Unidos	74	-Veganas: sem carne, mas ingestão de produtos de origem animal <1 vez/mês. -Vegetarianas: sem carne, mas ingestão regular de produtos de origem animal -Não vegetarianas: com carne	**Amostra de LH:** 1 **Micronutriente no LH:** B12 **Estágios de lactação:** após a 2ª semana pós-parto	Alta prevalência do uso de suplementos de B12 entre veganas, sem diferenças nas concentrações de B12 do LH por padrão de dieta materna.
Wiedeman et al. (2018)	Camboja e Canadá	n=301 no Canadá e n=67 no Camboja.	QFA entre a 16ª e 36ª semanas gestacionais, apenas em uma subamostra do Canadá (n=143).	**Amostra de LH:** 1 **Micronutriente no LH:** colina **Estágios de lactação:** 8 semanas pós-parto no Canadá.	Após o ajuste para múltiplas comparações, a ingestão de colina total, colina livre e formas hidrossolúveis de colina na dieta deixaram de ser correlacionadas com formas de colina no LH.
Daniels et al. (2019)	Indonésia	113	RA com pesagem dos alimentos de 12h (6h-18h) combinado com recordatórios de 12h (18h- 6h), para estimar ingestão total de alimentos 24h/dia, durante 3 dias não consecutivos.	**Amostra de LH:** 1 **Micronutriente no LH:** tiamina, riboflavina, niacina, B6, B12. **Estágios de lactação:** entre 2 e 5,5 meses pós-parto	Associações positivas entre as ingestões dietéticas maternas de riboflavina e niacina e concentrações de nicotinamida e de riboflavina livre no LH.

Autor (ano)	País	Amostra	Avaliação do consumo alimentar	Amostras dos micronutrientes do leite humano	Resultados
Perrin et al. (2019)	Estados Unidos	74	-Veganas: sem carne, mas ingestão de produtos de origem animal <1 vez/mês. -Vegetarianas: sem carne, mas ingestão regular de produtos de origem animal -Não vegetarianas: com carne	**Amostra de LH:** 1 **Micronutriente no LH:** colina **Estágios de lactação:** após a 2ª semana pós-parto	As concentrações totais de colina no LH não diferiram entre os padrões alimentares vegano, vegetariano e não vegetariano.
Henjum et al. (2020)	Noruega	175	Frequência média de consumo de 31 grupos de alimentos durante as últimas 4 semanas.	**Amostra de LH:** 4 em um único dia, (n=2) manhã e (n=2) tarde **Micronutriente no LH:** B12 **Estágios de lactação:** entre 1º e 6º mês pós-parto	Não houve associação entre a ingestão total de B12 e a concentração de B12 no LH.
Gibson et al. (2020)	Indonésia	212	RA com pesagem dos alimentos e recordatórios de 12h para estimar ingestão total, durante 3 dias não consecutivos. Coleta no 2º e no 5º mês pós-parto.	**Amostra de LH:** 2 **Micronutriente no LH:** tiamina, riboflavina, niacina, B6, B12. **Estágios de lactação:** no 2º e no 5º mês pós-parto	Associação positiva entre consumo materno de niacina e sua concentração (sob forma de nicotinamida) no LH apenas no 2º mês pós-parto.

Abreviaturas: L: litro; LH: Leite Humano; QFA: Questionário de frequência alimentar; RA: registro alimentar; R24h: recordatório de 24h

2.5.2 Indicadores antropométricos maternos

Foram identificados estudos relacionando o IMC materno e/ou o ganho de peso gestacional com as concentrações de ácidos graxos (MÄKELÄ et al., 2013), hormônios (KUGANANTHAN et al., 2017; SADR DADRES et al., 2019; SIMS et al., 2020), citocinas (WHITAKER et al., 2017) e microbiota do LH (CORTÉS-MACÍAS et al., 2021).

Há poucas evidências sobre a relação entre o IMC pré-gestacional ou durante a lactação e as concentrações das vitaminas do complexo B no LH. Xue et al. (2017) observaram que o IMC durante a lactação em mulheres chinesas foi inversamente associado às concentrações de vitamina B6, tiamina e folato. Estes autores justificaram a presença desta associação inversa com o fato de que a elevada retenção de peso pós-parto pode ser um forte fator de risco para várias doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), e levaria mulheres com sobrepeso e obesidade à maior preocupação com a dieta, com finalidade de controlar o peso corporal, porém resultando em menores concentrações destas vitaminas. Entretanto, esta explicação dada é conflituosa, visto que não foi observada correlação entre as vitaminas provenientes da ingestão dietética e as vitaminas do LH neste estudo.

Um estudo realizado na Tanzânia com 500 participantes revelou que o IMC>22 kg/m^2 durante a gestação dobrou as chances destas participantes terem baixas concentrações de vitamina B-12 no LH (< 310 pmol/L) (LWENO et al., 2020). Embora os mecanismos que relacionem a presença de sobrepeso ou obesidade e as concentrações das vitaminas do complexo B ainda não estejam bem elucidados (GARCÍA; LONG; ROSADO, 2009), especula-se que inadequações no peso corporal poderiam alterar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de micronutrientes e, consequentemente, causar deficiência de algumas vitaminas (PATRINI; GRIZIOTTI; RICCIARDI, 2004; MENSINK et al., 2013). Portanto, mais estudos são necessários para diminuir as lacunas existentes na relação entre o consumo dietético e indicadores antropométricos maternos e as concentrações destas vitaminas no LH.

2.6 Saúde mental materna

A OMS define saúde mental como um estado de bem-estar no qual um indivíduo percebe suas próprias habilidades, pode lidar com estresses normais da vida, pode trabalhar de forma

produtiva e é capaz de contribuir para sua comunidade (OMS, 2005). A depressão e a ansiedade são os principais transtornos mentais comuns (OMS, 2017). Os transtornos depressivos são caracterizados pela presença de tristeza, perda de interesse ou prazer, sentimento de culpa ou baixa autoestima, sono ou apetite perturbados, sensação de cansaço e falta de concentração. Por outro lado, os transtornos de ansiedade caracterizam-se por sentimentos de ansiedade e medo (OMS, 2017). Segundo as estimativas globais para 2015, aproximadamente 322 milhões (4,4%) de pessoas sofriam com transtornos depressivos e 264 milhões (3,6%) sofriam com transtornos de ansiedade, sendo ambos mais prevalentes nas mulheres quando comparadas aos homens (OMS, 2017).

Alterações na saúde mental estão entre as principais comorbidades durante o período perinatal (WOODS et al., 2010; HOWARD et al., 2014). Algumas mulheres percebem a gestação como uma fonte de alegria, satisfação e autorrealização, porém outras podem experienciar sentimentos de estresse (DOIS et al., 2012; RALLIS et al., 2014; YUKSEL; AKIN; DURNA, 2014). Algumas mudanças hormonais, sociais e emocionais decorrentes deste período podem tornar as mulheres mais propensas às desordens afetivas, como a ansiedade e depressão (RALLIS et al., 2014; SUNDAY; OKOLI; DINWOKE, 2018). Existem evidências de maior prevalência de sintomas depressivos no período gestacional quando comparado ao pós-parto (HERON et al., 2004). Paralelamente, estudos sugerem que a depressão pós-parto pode iniciar no período pré-gestacional ou gestacional (PARSONS et al., 2012; WISNER et al., 2013; HOWARD et al., 2014)

Alterações na saúde mental materna no período perinatal parecem ser mais prevalentes nos países de baixa e média renda quando comparados aos países de alta renda (PARSONS et al., 2012; DENNIS; FALAH-HASSANI; SHIRI, 2017; WOODY et al., 2017). A prevalência de sintomas depressivos varia de 7 a 20% em países de alta renda e pode ser superior a 20% em países de baixa renda (GELAYE et al., 2016). Ademais, estudos sugerem que a prevalência de ansiedade é maior do que a prevalência de depressão, embora estas comorbidades possam coexistir (LEE et al., 2007; FIGUEIREDO; CONDE, 2011). Uma revisão sistemática realizada com 102 estudos provenientes de 34 países, revelou prevalência de 18,2%, 19,1% e 24,6% de sintomas de ansiedade no primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional, além de uma prevalência de 15% na ocorrência de sintomas de ansiedade entre a primeira e vigésima quarta semana pós-parto, respectivamente (DENNIS; FALAH-HASSANI; SHIRI, 2017).

Fatores biológicos (idade, DCNT, paridade, complicações da gestação), psicológicos (histórico de psicopatologias próprio e familiar) e sociais (ausência de suporte social, eventos estressantes e negativos durante a vida, violência doméstica, ausência de intenção de engravidar, baixo status socioeconômico) têm sido relacionados a ocorrência de alterações na saúde mental materna no período perinatal (HOWARD et al., 2014; HAHN-HOLBROOK; CORNWELL-HINRICHS; ANAYA, 2018).

A nutrição é um importante determinante biológico da saúde mental e merece destaque. Existe um crescente interesse de estudos sobre a relação entre a nutrição e a saúde mental, incluindo a investigação do estado nutricional do indivíduo, a partir de marcadores bioquímicos, e da dieta como importantes fatores de risco modificáveis de tais condições (BODNAR; WISNER, 2005; LEYSE-WALLACE, 2013; MARX et al., 2017; TRUJILLO et al., 2018; FIRTH et al., 2020). Paralelamente, a relação entre nutrição e saúde mental parece ser bidirecional. A outra direção desta relação inclui evidências de que a presença de alterações da saúde mental pode ser responsável por promover mudanças comportamentais e estilos de vida não saudáveis, o que pode contribuir para deficiências nutricionais (BARKER et al., 2013; SAEED et al., 2015; BOUTTÉ et al., 2021).

Alguns estudos têm investigado a relação entre qualidade e padrões da dieta, deficiência de alguns nutrientes, o uso de suplementos nutricionais e a ocorrência de alterações na saúde mental no período perinatal (VAZ et al., 2013; VILELA et al., 2014; BASKIN et al., 2015; VILELA et al., 2015; BASKIN et al., 2017; VAZ et al., 2017; GALBALLY et al., 2021). As vitaminas do complexo B e o ácido docosahexaenóico (DHA), por exemplo, têm sido estudados por serem fundamentais para a síntese de neurotransmissores e, consequentemente, afetarem o humor e o comportamento (RECHENBERG; HUMPHRIES, 2013; VERLY-MIGUEL et al., 2015).

Alterações na saúde mental materna no período perinatal têm implicações a curto e longo prazo para saúde materno-infantil. Tais alterações vêm sendo relacionadas às mudanças no estilo de vida e redução da qualidade de vida materna, ao ganho de peso gestacional insuficiente, aos desfechos gestacionais adversos, atrasos no desenvolvimento emocional e cognitivo infantil, além do aumento do risco de depressão no final da infância e adolescência (PAGOTO et al., 2009; PEARSON et al., 2013; KINGSTON; TOUGH et al., 2014; STEIN et al., 2014; GELAYE et al., 2016; REES; CHANNON; WATERS, 2019; FARIAS et al., 2021). Estudos revelaram maior risco

de má nutrição, aleitamento materno não-exclusivo e de doenças comuns na infância em crianças nascidas de mulheres com depressão no pós-parto (DADI; MILLER, MWANRI, 2020; FARÍAS-ANTÚNEZ et al., 2020; DOS SANTOS MORAES et al., 2021).

2.6.1 Saúde mental materna e vitaminas do complexo B

Evidências sugerem a existência da relação entre as concentrações sanguíneas e/ou ingestão dietética das vitaminas do complexo B e alterações na saúde mental, entretanto, os resultados ainda não são consistentes. Uma revisão sistemática seguida de metanálise, com 18 estudos referente a população geral, revelou que a ingestão dietética de tiamina, riboflavina, piridoxina e cobalamina foi inversamente associada ao risco de depressão, porém esta associação foi significativa apenas para as mulheres (WU et al., 2021). Em um estudo transversal com 7.387 adultos iranianos, entre 20 e 70 anos, foi observado que uma maior ingestão dietética de vitaminas do complexo B foi associada a uma menor prevalência de sintomas de depressão, ansiedade e estresse (MAHDAVIFAR et al., 2021).

A riboflavina, piridoxina, cobalamina, o folato e a colina são mais estudadas por participarem das vias metabólicas da homocisteína (**Figura 1**) relacionadas às reações de transferência de unidade de carbono (KALHAN, 2016; CLARE et al., 2019). A homocisteína é um aminoácido que participa de dois processos metabólicos: remetilação e transulfuração (SELHUB, 1999; SELHUB, 2008).

Na via de remetilação da homocisteína, a cobalamina desempenha papel importante na formação da S-adenosilmetionina (SAM), que é um doador universal de grupamento metil (FRANKENBURG, 2007; SANCHEZ-VILLEGAS et al., 2009; BOTTIGLIERI, 2013). A diminuição da síntese da SAM pode limitar a síntese dos neurotransmissores e já existem evidências sobre os seus efeitos antidepressivos (MISCHOULON; FAVA, 2002). A SAM, após a doação do grupo metil, origina a S-adenosilhomocisteína (SAH) que é posteriormente hidrolisada, originando a homocisteína. A homocisteína fica disponível para remetilação ou para via de transulfuração (SELHUB, 1999; KALHAN, 2016). Na via de transulfuração, a piridoxina é cofator da enzima que converte a homocisteína em cistationina e da enzima que converte a cistationina em cisteína e α-cetobutirato (DALTO; MATTE, 2017) (**Figura 1**).

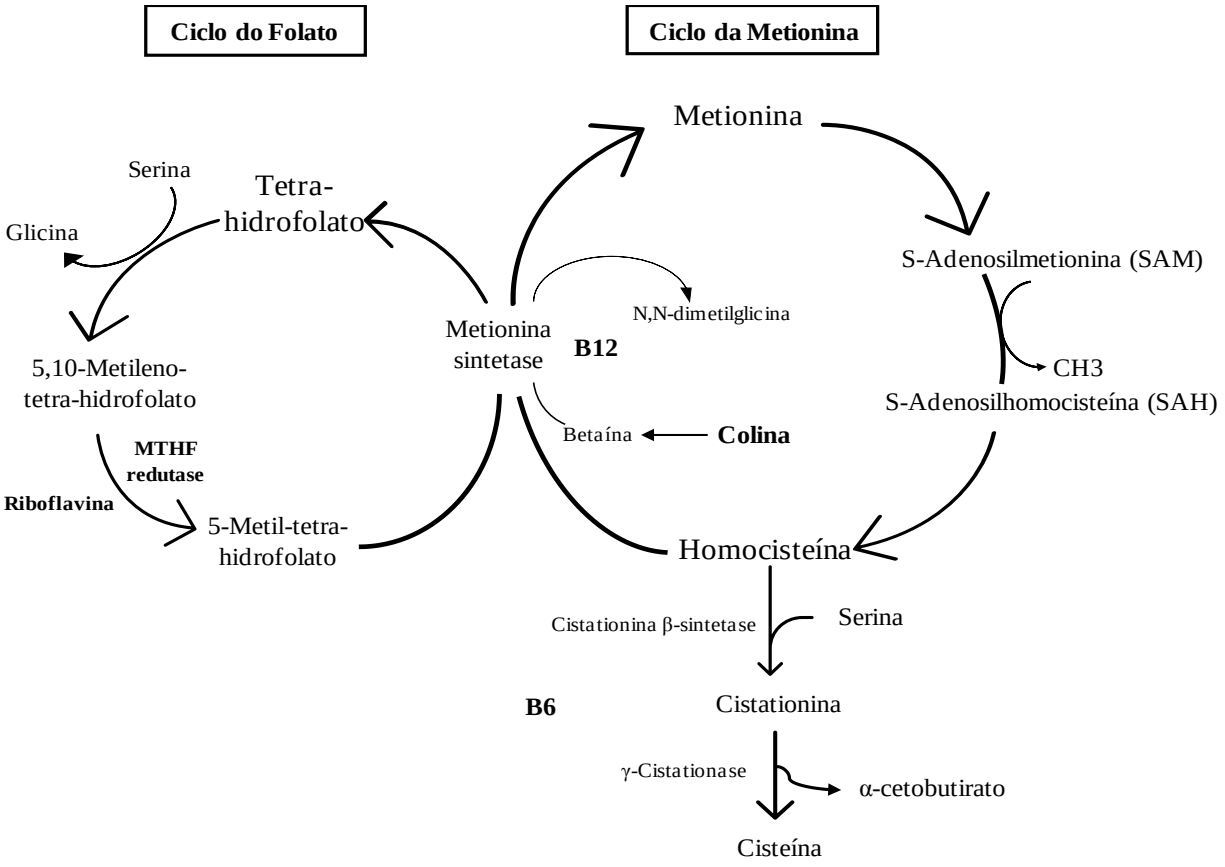


Figura 1. Metabolismo da homocisteína.

A deficiência de piridoxina, cobalamina, folato e condições adversas de saúde, tal como a insuficiência renal, podem elevar as concentrações de homocisteína (ALLEN et al., 2018). Estas altas concentrações podem ter efeitos neurotóxicos ao promover a ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e, consequentemente, aumentar o risco de depressão (MORETTI et al., 2017). Entretanto, em populações com nutrição adequada e em países com programas de fortificação com ácido fólico, a deficiência de B12 parece ser a principal causa das concentrações elevadas de homocisteína (GREEN; MILLER, 2005).

As evidências para o período perinatal ainda são escassas. As vitaminas D, cobalamina e o folato são as mais estudadas em relação ao possível efeito na saúde mental neste período, mas os resultados ainda não estão bem estabelecidos (SPARLING et al., 2017).

Em um estudo transversal realizado com 86 gestantes japonesas não foi observada associação significativa entre a presença de sintomas depressivos no primeiro trimestre, avaliada pela escala do *Center for Epidemiologic Studies-Depression (CES-D)*, e concentrações elevadas de homocisteína, deficiências de folato sérico ou ingestão de folato, piridoxina e cobalamina (WATANABE et al., 2010). Outro estudo, transversal, realizado com 365 gestantes indianas também não observou diferença entre a ingestão de cobalamina e folato dietético e nem das concentrações sanguíneas de cobalamina, homocisteína e folato entre participantes com ou sem sintomas depressivos no primeiro trimestre gestacional, avaliado pela escala *Kessler Psychological Distress Scale (K-10*) (LUKOSE et al., 2014). Por outro lado, dados secundários de 174 mulheres grávidas, provenientes do *National Health and Nutrition Examination Survey* (*NHANES*), referente aos anos de 2005–2006, revelou que gestantes com concentrações séricas baixas e normais de cobalamina apresentaram 3,8 vezes mais chances de sofrer de depressão, avaliada pelo questionário *Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9)*, após ajuste para potenciais confundidores (PEPPARD et al., 2019).

Em uma coorte inglesa com 2.856 participantes, Blunden et al. (2012) observaram que apresentar histórico de alteração na saúde mental foi positivamente associado aos sintomas depressivos no pós-parto, avaliado pela escala *Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS)*, porém, amamentar até 6 meses foi um fator negativamente associado a estes sintomas. Adicionalmente, não foram observadas associações da ocorrência de sintomas depressivos no pós-parto com o status de folato e a ingestão dietética de folato, piridoxina e cobalamina antes ou durante a gestação (BLUNDEN et al., 2012). Em um estudo transversal, realizado com 217 mulheres indianas, na sexta semana após o parto, foi observado que a probabilidade de depressão pós-parto, avaliada pela escala EPDS, diminuiu em 0,39 vezes para cada aumento de unidade nas concentrações sanguíneas de cobalamina (OR = 0,394; IC 95%: 0,189-0,822) e em 0,29 vezes (OR = 0,293; IC 95%: 0182–0,470) para combinação de biomarcadores de *status* de cobalamina (B12 total, holotranscobalamina, homocisteína e ácido metilmalônico), após o ajuste para características sociodemográficas e nutricionais (DHIMAN et al., 2021).

Chong et al. (2014), em um estudo com dados de 635 mulheres pertencentes a coorte GUSTO, realizada em Cingapura, avaliaram a relação entre as concentrações plasmáticas de folato e cobalamina, e sintomas depressivos, ambos medidos entre 26 e 28 semanas gestacionais (SG), e

sintomas depressivos aos três meses após o parto, avaliados usando a escala EPDS. As concentrações plasmáticas de cobalamina não foram associadas à depressão perinatal, entretanto, menores concentrações de folato foram associadas a presença de sintomas depressivos na gestação, mas não aos três meses pós-parto (CHONG et al., 2014). Estes autores chamam atenção para o fato de que esta foi uma associação transversal e ainda não existe clareza se o folato é causa ou consequência da depressão.

Neste contexto, ainda existem lacunas que impossibilitam o completo entendimento da direcionalidade da relação entre as vitaminas do complexo B e a ocorrência de sintomas de ansiedade e depressão. É preciso destacar que muitos estudos nesta temática são transversais e apresentam a causalidade reversa como limitação. É possível que existam dois caminhos que expliquem esta relação. O mais estudado é explicado pela deficiência de um nutriente (exemplo: folato, cobalamina) que gera alterações na saúde mental, via mecanismos fisiológicos de elevação das concentrações de homocisteína e prejuízos na síntese de neurotransmissores (CHONG et al., 2014; PEPPARD et al., 2019; DHIMAN et al., 2021). O segundo caminho, menos estudado, seria explicado pelo fato de que a presença de sintomas depressivos e de ansiedade provoca alterações comportamentais, incluindo modificações nos hábitos alimentares, que colocam os indivíduos em maior risco para o desenvolvimento de deficiência de nutrientes (BARKER et al., 2013; SAEED et al., 2015; BOUTTÉ et al., 2021). Um estudo experimental, por exemplo, sugeriu que as concentrações elevadas de homocisteína parecem ser um resultado da depressão induzida pelo estresse em ratos e não a causa desta depressão (CHENGFENG et al., 2014).

2.6.2 Saúde mental materna e composição do leite humano

Os estudos que avaliaram possíveis associações entre estresse e alterações na saúde mental materna e a composição do LH têm foco direcionado, principalmente, para a saúde mental materna no pós-parto e para os componentes imunológicos do LH (DI BENEDETTO et al., 2020; APARICIO et al., 2020; ZIOMKIEWICZ et al., 2021; ZIOMKIEWICZ et al., 2021).

Poucos estudos avaliaram a saúde mental materna pré-natal e a composição do LH. Um estudo com 287 participantes, realizado nos Estados Unidos, avaliou sintomas depressivos utilizando a escala CES-D durante a 20ª e entre a 24ª e 29ª semana gestacional e observou que os sintomas depressivos na 20ª semana gestacional foram negativamente associados às concentrações

de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa no LH no quarto mês pós-parto (KEIM et al., 2012). Estudo realizado com 120 mulheres finlandesas, com o objetivo de avaliar se os sintomas de depressão (avaliado pelo EPDS) e ansiedade (avaliado pelas escalas *Symptom Checklist-90 anxiety subscale*- SCL-90 e *Pregnancy Anxieties Questionnaire*-PRAQ) pré-natais estão associados ao metaboloma do LH, observou que o estresse psicológico pré-natal, incluindo avaliação de sintomas de ansiedade e depressão, foi positivamente associado às concentrações de dez metabólitos do LH aos 2,5 meses pós-parto (KORTESNIEMI et al., 2021).

No pós-parto, o estresse materno (avaliado pelo *Recent Life Changes Questionnaire*) foi negativamente associado à densidade energética, gordura e ácidos graxos no LH (ZIOMKIEWICZ et al., 2021). Apenas um estudo avaliou a associação entre saúde mental materna no pós-parto e concentração de vitaminas no LH. Este estudo transversal avaliou a associação entre os sintomas depressivos maternos no pós-parto (avaliado pelas escala CES-D) e a concentração de vitamina B6 no LH em uma amostra de 25 lactantes e não encontrou nenhuma associação estatisticamente significativa (BOYLAN, 2002).

3 JUSTIFICATIVA

Alterações na composição do LH colocam a criança em estado de vulnerabilidade, especialmente no período de AME, quando o LH é a única fonte de nutrição. Neste contexto, as vitaminas do complexo B e colina são nutrientes essenciais que participam de diversas reações metabólicas no nosso organismo. Além disso, fazem parte de um grupo de micronutrientes do LH que é diretamente impactado pelo estado nutricional materno. Portanto, alterações na saúde materna podem resultar em deficiência maternas destas vitaminas e, consequentemente, em um estado nutricional infantil inadequado, por meio das baixas concentrações no LH.

Outra questão relevante que justifica a realização desta tese diz respeito à expressiva prevalência de alterações na saúde mental materna no período perinatal e seus impactos na saúde da mãe e da criança. Entender como sintomas depressivos e de ansiedade durante este período podem alterar a composição do LH é fundamental, tendo em vista as possíveis implicações de uma composição inadequada no estado nutricional infantil.

Diversas evidências científicas ratificam a importância do AM para saúde materno-infantil. No entanto, ainda existem importantes aspectos a serem investigadas no tocante à composição do LH, visto que os estudos nesta área são escassos e existem importantes limitações metodológicas naqueles que avaliaram os micronutrientes do LH. Adicionalmente, existem evidências limitadas e conflitantes sobre a relação entre estado nutricional materno e a composição do LH. Portanto, o IMC e a alimentação materna merecem ser investigados, considerando que o estado nutricional materno inadequado tem associação com importantes desfechos adversos à saúde materno-infantil, que estes são fatores modificáveis e que podem interferir nas concentrações de micronutrientes do LH. Deste modo, a melhor compreensão dos fatores que afetam a composição do LH poderá auxiliar em ações voltadas para a melhoria das concentrações circulantes destes micronutrientes nas mulheres em idade reprodutiva, no LH e na infância, além de reforçar políticas públicas voltadas ao incentivo do AM no país.

4 HIPÓTESES

Artigo 1

- A presença de sobrepeso e obesidade pré-gestacional, o consumo alimentar abaixo das recomendações durante a gestação e no pós-parto e menores concentrações das vitaminas do complexo B e colina do leite humano nos primeiros dias de lactação estão associados às menores concentrações destes micronutrientes do leite humano nos três primeiros meses de lactação.

Artigo 2

-A presença de sintomas depressivos e de ansiedade na gestação estão relacionadas às maiores concentrações séricas de homocisteína e menores concentrações de vitamina B12 sérica e no leite humano.

-As concentrações de vitamina B12 no leite humano são positivamente associadas às concentrações de vitamina B12 e negativamente associadas às concentrações de homocisteína no soro materno.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar fatores associados às trajetórias das concentrações das vitaminas do complexo B e colina no leite humano e investigar associação entre sintomas depressivos e de ansiedade, estado nutricional materno de vitamina B-12 e concentrações de B-12 no leite humano.

5.2 Objetivos específicos

Artigo 1

i. Descrever as concentrações de vitaminas do complexo B e colina do leite humano nos três primeiros meses pós-parto.

ii. Estimar a associação entre os fatores maternos, as concentrações das vitaminas do complexo B e colina do leite humano entre 2-8 dias de lactação e as mudanças nas trajetórias das concentrações das vitaminas do complexo B e colina no leite humano nos três primeiros meses pós-parto.

Artigo 2

i. Descrever as correlações entre as concentrações séricas de B12 e de homocisteína materna e as concentrações de B12 no leite humano até o primeiro mês pós-parto.

ii. Verificar a associação entre os sintomas de depressão e de ansiedade e as concentrações séricas de homocisteína e de vitamina B12 até o primeiro mês pós-parto.

iii. Verificar a associação entre os sintomas de depressão e de ansiedade e as concentrações de vitamina B12 no leite humano até o primeiro mês pós-parto.

6 MÉTODOS

6.1 Delineamento, local e população-alvo do estudo

O presente estudo contempla um delineamento longitudinal com uma linha de base e cinco visitas de acompanhamento. A linha de base do estudo ocorreu no pré-natal, no intervalo entre a 28ª e 35ª SG. A entrevista 1 ocorreu no puerpério imediato, no intervalo de 2 a 8 dias pós-parto; a entrevista 2 ocorreu no intervalo de 28 –50 dias pós-parto (~1 mês pós-parto); a entrevista 3 ocorreu no intervalo de 88- 119 dias (~3º mês pós-parto); a entrevista 4 ocorreu no intervalo de 180 a 216 dias pós-parto (~ 6º mês pós-parto); a entrevista 5 ocorreu no intervalo de 365 a 404 dias pós-parto (~12º mês pós-parto) (**Figura 2**).

Este estudo foi constituído por uma amostra de conveniência de gestantes e seus filhos, usuários de uma Clínica da Família localizada em uma comunidade de baixa renda na Zona Norte da cidade do Rio de Janeiro. Esta clínica funciona de acordo com o Programa Estratégia de Saúde da Família, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS).

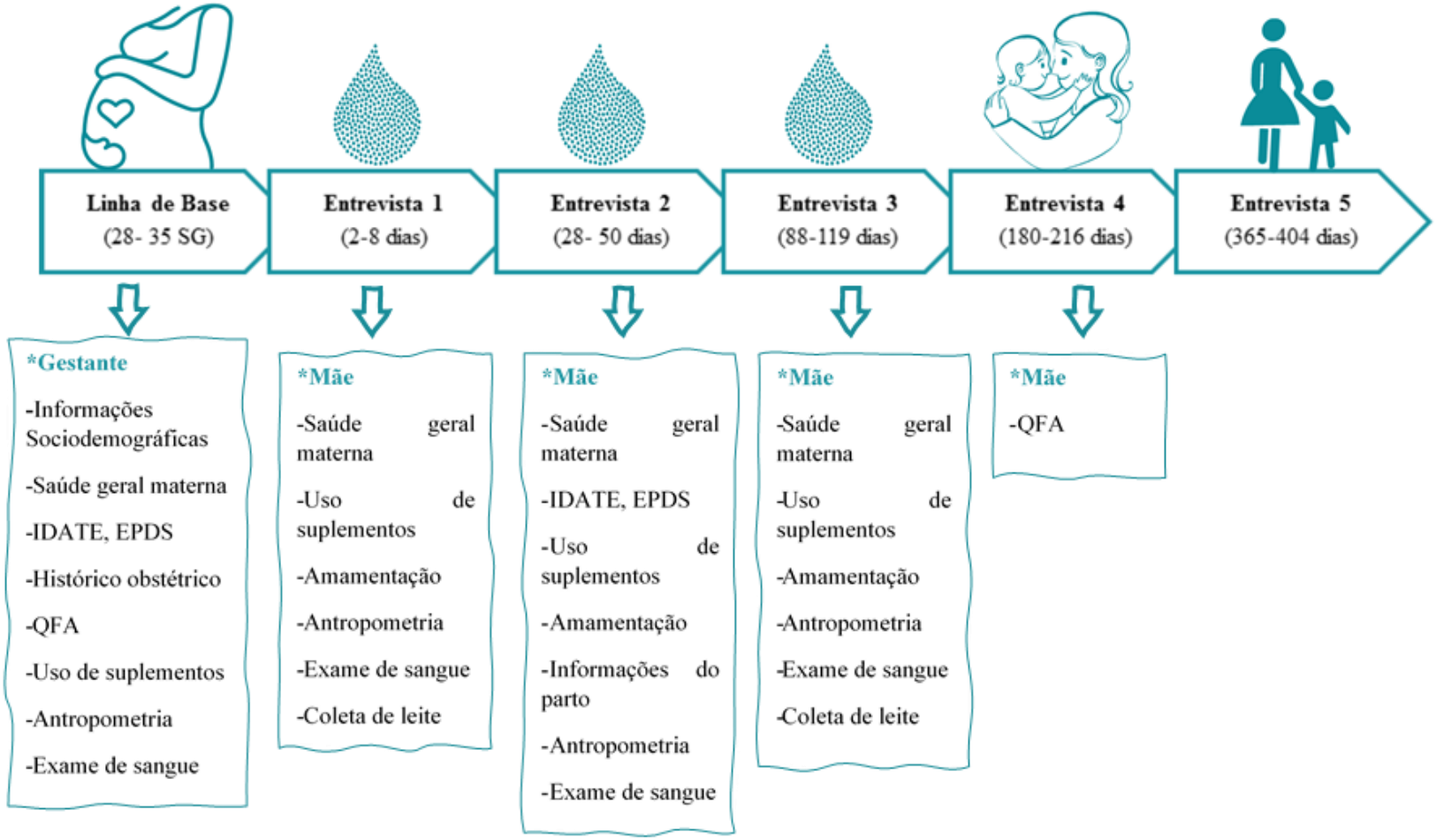


Figura 2. Fluxograma da coorte e informações coletadas em cada entrevista.

Abreviaturas: EPDS: Escala de depressão de Edimburgo, IDATE: Inventário de ansiedade traço-estado, QFA: Questionário de frequência alimentar; SG: semanas gestacionais.

6.2 Participantes

6.2.1 Critérios de elegibilidade

As gestantes que atenderam aos seguintes critérios de elegibilidade foram convidadas para participar do estudo: idade entre 18 e 40 anos; realizar o acompanhamento pré-natal no local de estudo; idade gestacional entre 28ª e 35ª semanas gestacionais; ser livre de DCNT (exceto obesidade, IMC $\geq$ 30 kg/m^2) e de doenças infecciosas; não apresentar gestação gemelar e residir na área programática do estudo.

6.2.2 Critérios de exclusão

Para a definição da amostra final do estudo foram adotados os seguintes critérios de exclusão: mulheres que não estavam amamentando ou que não coletaram amostras de LH durante as entrevistas 1, 2 e 3 do pós-parto; gestantes que desenvolveram DCNT (exceto obesidade) ou doenças infecciosas, após o ingresso no estudo; crianças nascidas pré-termo (nascimento < 37 SG). Para cada artigo foram feitas exclusões específicas conforme as **Figuras 3** e **4**.

6.2.3 Captação das participantes

As gestantes foram abordadas sobre o interesse em participar da pesquisa durante o período de espera para as consultas de pré-natal. Após este contato inicial, foi realizada a aplicação de um questionário de rastreamento, incluindo as seguintes questões: nome, idade, intenção em permanecer residindo na área programática do estudo após o parto, idade gestacional (informação posteriormente confirmada a partir da ultrassonografia), diagnóstico de DCNT ou doenças sexualmente transmissíveis, uso de medicamentos para tratamento de doença psiquiátrica, interesse em amamentar, peso pré-gestacional e telefone de contato.

As gestantes elegíveis eram contatadas por telefone e a primeira visita era agendada. A gestante era convidada a participar do estudo durante a visita 1, e assinava o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) quando confirmasse o interesse.

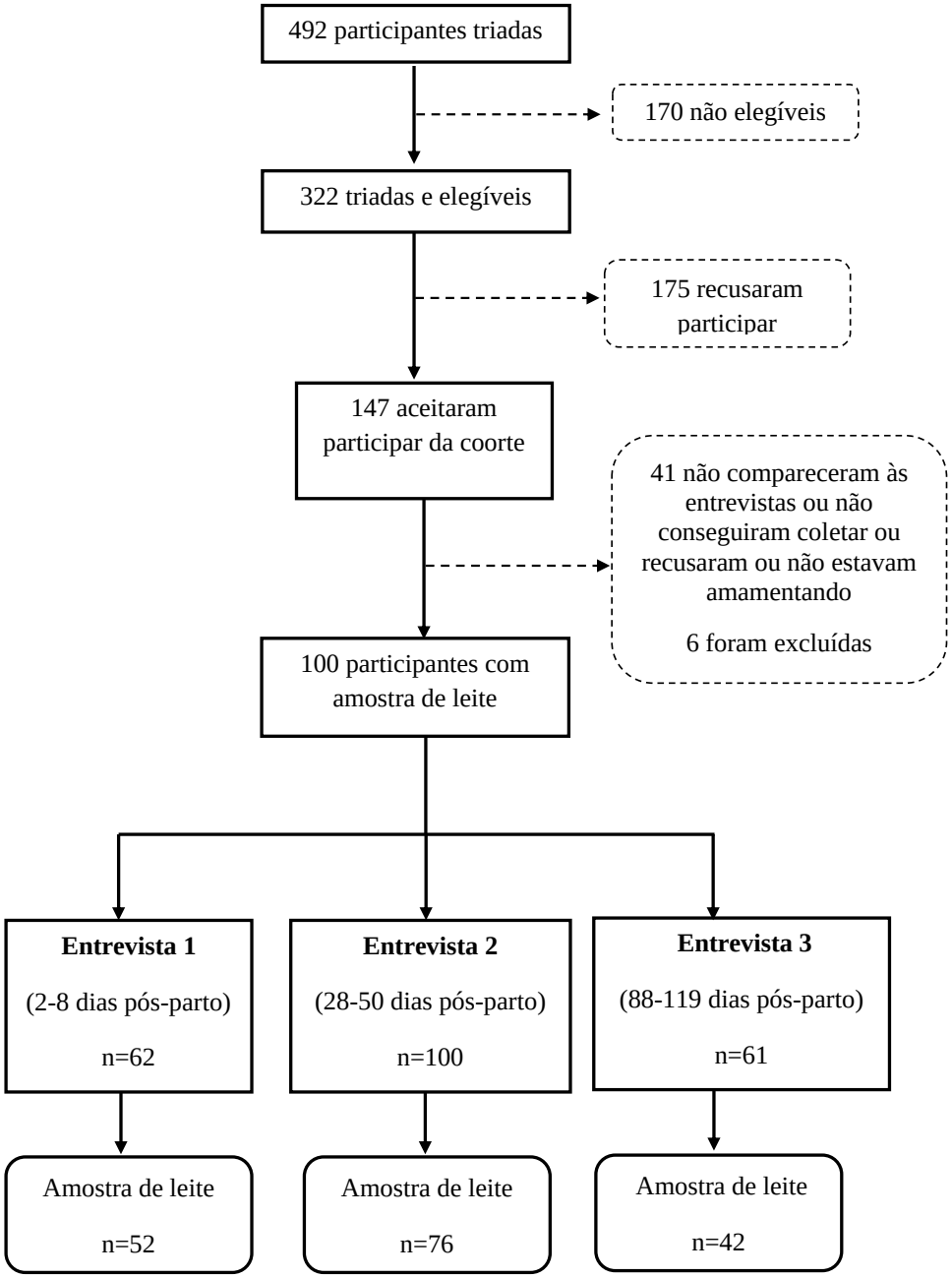


Figura 3. Fluxograma do recrutamento e seleção das participantes incluídas no artigo 1.

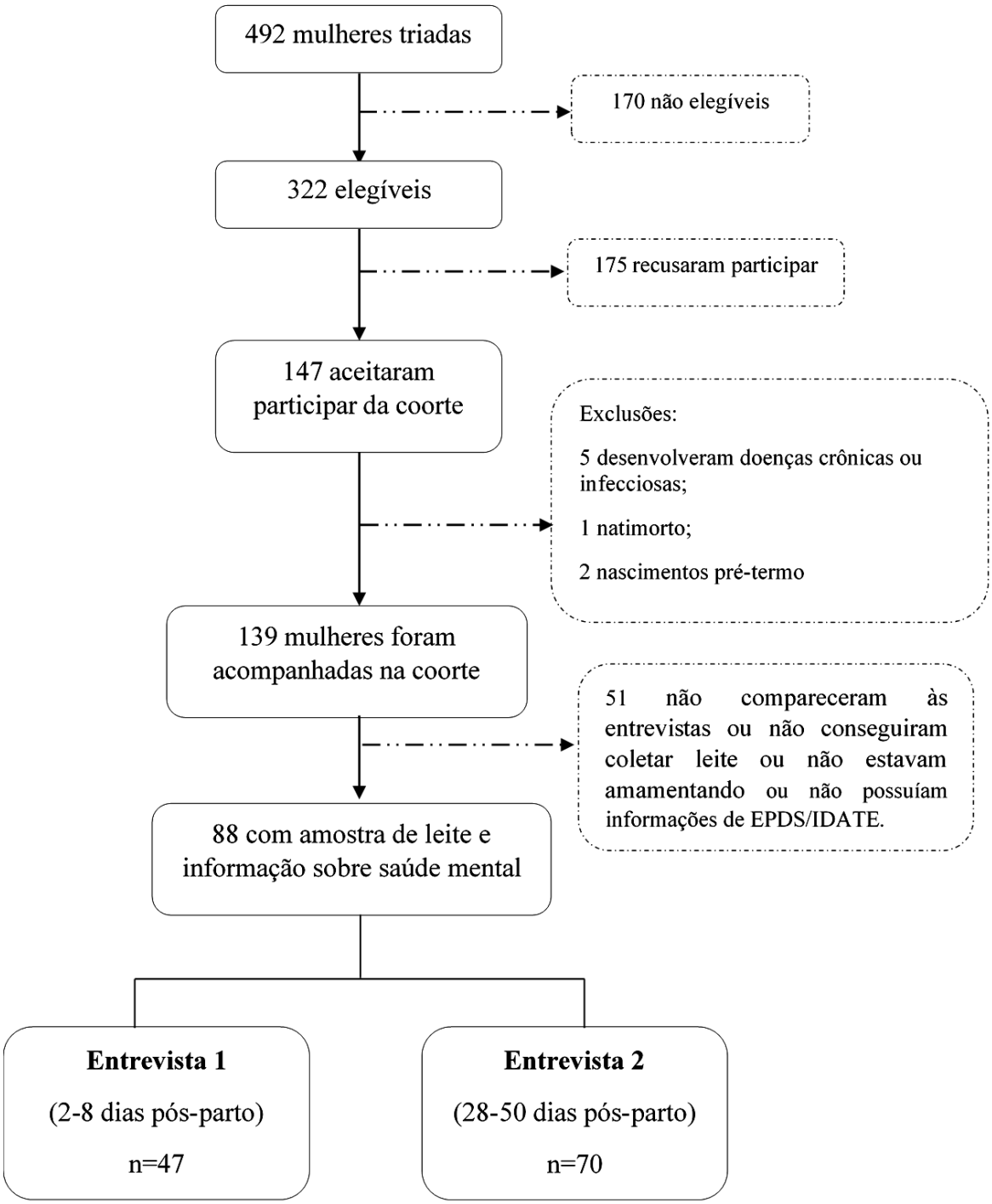


Figura 4. Fluxograma do recrutamento e seleção das participantes incluídas no artigo 2.

6.3 Procedimentos de coleta de dados e amostras biológicas

6.3.1 Coleta e entrada de dados

O *Research Eletronic Data Capture* (REDCap) foi utilizado para a coleta de dados. Trata-se de um *software* que permite a geração do banco de dados em sua plataforma online. Os questionários foram aplicados em um *tablet*, de forma offline e diariamente enviados para a plataforma *online*. Essa ferramenta tem sido considerada segura para a gerenciamento de bancos de dados (http://project-redcap.org/).

O controle de qualidade na coleta de dados foi realizado diariamente por meio da utilização de valores limites nos campos de resposta dos questionários definidos previamente, possibilitando a redução de erros no preenchimento dos formulários pelo entrevistador, e revisão dos questionários aplicados.

6.3.2 Antropometria materna

Os pesos pré-gestacional e da última consulta antes do parto foram coletados da caderneta da gestante utilizada no acompanhamento pré-natal da Clínica da Família. O peso e a estatura foram aferidos em cada visita de acompanhamento. Esse procedimento foi realizado por um pesquisador treinado, de acordo com o protocolo proposto por Lohman et al. (1988). O peso foi aferido em todas as visitas de acompanhamento com o auxílio da Balança Seca 704 (Seca, Hamburg, Alemanha) e a estatura foi medida na segunda entrevista do pós-parto com o auxílio do Estadiômetro Alturexata® (Belo Horizonte, Brasil), com escala bilateral em milímetros e campo de uso de 0,35 até 2,13 metros.

Os índices de massa corporal (IMC) pré-gestacional e em cada visita foram obtidos por meio da divisão do peso (em quilogramas) pela estatura ao quadrado (em metros). A classificação do IMC foi realizada de acordo com a OMS: baixo peso (<18,5 kg/m^2), eutrofia (18,5-24,9 kg/m^2), sobrepeso (25,0-29,9 kg/m^2) e obesidade (≥30,0 kg/m^2) (OMS, 1995).

6.3.3 Sintomas depressivos e de ansiedade

Os sintomas depressivos e de ansiedade foram avaliados na linha de base e na entrevista 2. Os sintomas depressivos foram avaliados com a escala EPDS, uma das ferramentas de triagem

mais comuns usada no período perinatal (HEWITT et al., 2010; O'CONNOR et al., 2015). A EPDS é uma escala de triagem composto por 10 itens que avaliam a ocorrência de sintomas depressivos ao longo dos últimos sete dias (COX; HOLDEN; SAGOVSKY, 1987; MURRAY; COX, 1990). Cada item dessa escala possui quatro possibilidades de resposta cuja pontuação varia de 0 a 3, com pontuação máxima de 30. Nesta tese optamos por utilizar o ponto de corte ≥11 para avaliar a prevalência de sintomas depressivos (LEVIS et al., 2020).

Os sintomas de ansiedade foram avaliados com o Inventário de Ansiedade Traço-estado (IDATE) que investiga dois tipos de ansiedade: ansiedade traço e estado (SPIELBERGER et al., 1983). A ansiedade-traço refere-se às características de personalidade estáveis e relativamente permanentes. A ansiedade-estado refere-se a um estado emocional transitório relativo a um período específico. O inventário consiste em 40 itens divididos em duas subescalas distintas de 20 itens cada, com opções de resposta variando de 1 a 4 pontos. A pontuação total do IDATE para cada subescala (ansiedade-estado e ansiedade-traço) varia de 20 a 80 (SPIELBERGER et al., 1983). No presente estudo, usamos apenas a ansiedade-estado, visto que a ansiedade-traço foi avaliada apenas na linha de base. Foi considerado o ponto de corte ≥40 para avaliar a prevalência de sintomas de ansiedade-estado (BIAGGIO et al., 1979).

Tanto o EPDS quanto o IDATE foram validados para serem utilizados no período gestacional e pós-parto (MURRAY; COX, 1990; TENDAIS et al., 2014) e foram traduzidos e adaptados para uso no Brasil (BIAGGIO; NATALIACIO, SPIELBERGUER, 1977; BIAGGIO; NATALIACIO, 1979; SANTOS et al., 2007). Maiores pontuações no EPDS e no IDATE representam maior severidade na ocorrência de sintomas depressivos e de ansiedade, respectivamente.

6.3.4 Concentrações séricas de vitamina B-12 e homocisteína

Após jejum de 8-12 horas, amostras de sangue materno foram coletadas na linha de base e nas entrevistas 1, 2 e 3. Estas amostras foram coletadas em tubos contendo gel separador e centrifugadas em até 1 hora após a coleta. O soro foi separado em alíquotas de 1 mL e armazenado a −80 ° C até a análise. As concentrações séricas de vitamina B-12 foram analisadas utilizando imunoensaios por quimioluminescência em um sistema automatizado *UniCel DxI 800* (Beckman Coulter, Brea, EUA). As concentrações séricas de homocisteína foram determinadas por meio de

imunoensaios por quimioluminescência no sistema *Abbott Alinity i* (Abbott Diagnostics, Chicago, EUA). Os estados deficiente e marginal de vitamina B-12 foram definidos quando a concentração sérica foi <148 pmol/L e entre 148-221 pmol/L, respectivamente (IOM, 1998); as concentrações séricas de homocisteína >12µmol/L foram definas como hiperhomocisteínemia (BAE et al., 2015). Estas classificações foram usadas apenas no período pós-parto, considerando que eles superestimam a prevalência de deficiência de B-12 na gestação (ALLEN et al., 2018).

6.3.5 Consumo alimentar materno

O consumo alimentar das participantes foi avaliado durante a gestação e no pós-parto. O primeiro questionário de frequência alimentar (QFA) foi administrado entre a 28ª e 35ª semanas gestacionais. Esse instrumento era composto por 85 itens alimentares e foi previamente validado no Brasil para estimar a ingestão de nutrientes ao longo da gestação (BARBIERI et al., 2013; BARBIERI et al., 2015). O segundo QFA foi administrado seis meses após o parto para avaliar a ingestão materna usual ao longo destes seis meses. Este instrumento consistia em 114 itens alimentares e foi validado para estimar a ingestão de nutrientes entre mulheres brasileiras adultas (BENSEÑOR et al., 2013; MOLINA et al., 2013).

A estimativa da quantidade de consumo diário foi obtida pela multiplicação da frequência diária e a gramatura referente a cada alimento. O consumo energético total e os macronutrientes e micronutrientes foram calculados com o auxílio de informações da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) (NEPA–UNICAMP, 2011) e Tabelas de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), gerada a partir da Pesquisa de Orçamento Familiar (2008-2009) (BRASIL, 2011). A tabela americana do *United States Department of Agriculture* foi usada (USDA, 2011) na ausência de algum alimento nestas tabelas nacionais. As participantes que tiveram ingestão de energia implausível (< 600 e > 6.000 kcal / dia) durante a gestação (n = 5) e pós-parto (n = 1) foram excluídas das análises de consumo alimentar (ALVES-SANTOS et al., 2016).

A gramatura dos itens do QFA relacionados ao consumo de carne bovina, peixe, frango, ovos e leite (integral e desnatado) foram somadas para criar estes respectivos grupos de alimentos, visto que são fontes alimentares primária das vitaminas do complexo B.

Os nutrientes (cada vitamina do complexo B e colina) e os grupos dos alimentos de origem animal (carne bovina, peixe, frango, ovos e leite) estimados foram ajustados para a ingestão energética diária total por meio do método do resíduo (WILLET et al., 1997). Neste método, são coletados os resíduos provenientes de uma regressão linear simples, tendo o consumo energético total como variável independente e o nutriente ou grupo de alimento de origem animal como variável dependente. Estes resíduos representam a parte dos nutrientes ou grupo de alimento que não são explicadas pelo consumo energético total e devem ser somados a uma constante. Esta constante representa o consumo do nutriente para a média de energia total consumida pela população do estudo. A soma do resíduo com a constante resulta no nutriente ajustado (WILLET et al., 1997).

As necessidades médias harmonizadas (do inglês, *Harmonized Average Requirements - H-ARs*) (ALLEN; CARRIQUIRY; MURPHY, 2020) e a ingestão dietética diária recomendada (do inglês, *Recommended Daily Allowances- RDAs*) (IOM, 1998) foram usadas como referências para avaliação do consumo alimentar. Os H-ARs são recomendados para avaliar a inadequação da ingestão alimentar nas populações. Em contraste, as RDAs são usadas para avaliar a ingestão e o planejamento das refeições para indivíduos. A ingestão adequada (do inglês, Adequate Intake - AI) é utilizada na avaliação e planejamento dietético individual para nutrientes que não dispõe de valores de RDA (por exemplo, ácido pantotênico e colina). As H-ARs foram usadas para estimar a prevalência de ingestão inadequada de micronutrientes durante a gestação e o pós-parto. As RDAs/AIs foram usadas nos modelos que avaliaram as mudanças longitudinais nas concentrações das vitaminas do complexo B e colina no LH e que tinham o consumo alimentar durante a gestação e o pós-parto como exposição. As H-ARs foram inicialmente consideradas nesta abordagem, devido ao seu uso recomendado na avaliação da prevalência de inadequação do consumo. No entanto, a baixa frequência de ingestões inadequadas inibiu a convergência dos modelos. Dada a escassez de evidência avaliando a ingestão dietética materna associada às mudanças longitudinais nas concentrações de nutrientes do leite humano, apresentamos comparações em relação às RDAs/AIs para estimular futuras evidências experimentais neste campo (**Quadro 6**).

Quadro 6. Recomendações de ingestão dietética de vitaminas do complexo B durante a gestação e lactação.

Vitaminas	Gestação		Lactação	
	RDA/AI (mg/dia)[a]	**H-ARs (mg/dia)[b]**	**RDA/AI (mg/dia)[a]**	**H-ARs (mg/dia)[b]**
Tiamina	1,4[c]	1,2	1,4[c]	1,2
Riboflavina	1,4[c]	1,5	1,6[c]	1,7
Niacina	18[c]	14	17[c]	13
Ácido pantotênico	6[d]	4	7[d]	5,6
B6	1,9[c]	1,5	2,0[c]	1,4
B12	2,6[c,e]	2,2	2,8[c,e]	2,4
Colina	450[d]	384	550[d]	416

Notas:
[a]*Institute of Medicine*, 1998
[b]ALLEN; CARRIQUIRY; MURPHY, 2020
[c]RDA
[d]AI
[e]A RDA para vitamina B12 é dada em microgramа/dia.
Abreviaturas: RDA= Ingestão dietética diária recomendada (do inglês, *Recommended Dietary Allowances*; AI= Ingestão Adequada (do inglês, *Adequate Intake*; H-ARs= Necessidade média harmonizada (do inglês, *Harmonized Average Requirements*).

6.3.6 Coleta de leite humano

Para a coleta de LH foi elaborado um protocolo (**ANEXO 1**) baseado nas recomendações da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 171 (BRASIL, 2006) e nas determinações da RBLH (BRASIL, 2008). Mulheres em aleitamento materno sob livre demanda foram orientadas a coletar amostras de leite nas entrevistas 1, 2 e 3, seguindo procedimentos estabelecidos pelo protocolo.

As participantes coletaram leite, preferencialmente pela manhã, após o café da manhã (até ~ 10h). As amostras de leite foram coletadas de uma mesma mama por meio de ordenha manual. Antes de iniciar a coleta, as participantes foram orientadas a lavar as mãos e colocar máscaras para proteção do rosto e touca com a finalidade de evitar contaminação da amostra durante o processo.

O entrevistador treinado também realizava os mesmos procedimentos de higiene, pois, se necessário, poderia auxiliar o participante na extração da amostra de leite utilizando luvas nitrílicas (FERREIRA et al., 2020).

Foram coletados 5 mL de leite de cada participante na entrevista 1, e 17 mL nas entrevistas 2 e 3. Embora a mama não tenha sido totalmente esvaziada, estudos anteriores mostraram que as concentrações de vitaminas hidrossolúveis no leite permanecem relativamente estáveis durante o episódio de amamentação (leite anterior e posterior) (ALLEN; HAMPEL, 2019).

As amostras foram coletadas diretamente em tubos cônicos tipo Falcon® de 50 mL, estéreis, sem ribonuclease (RNase), sem desoxirribonuclease (DNase) e não pirogênicos. As amostras foram homogeneizadas e aliquotadas assepticamente imediatamente após a coleta. Neste contexto, uma alíquota de 1 mL de leite foi separada em cada uma das entrevistas para análises de vitaminas do complexo B e colina. As amostras foram congeladas a -20°C e transportadas em caixa com temperatura controlada (-1°C a -5°C) até a Universidade Federal do Rio de Janeiro e armazenadas a -80°C. As amostras congeladas foram enviadas em gelo seco para análise no USDA/ARS-*Western Human Nutrition Research Center*, Davis, Califórnia, Estados Unidos.

6.3.7 Análise das vitaminas do complexo B no LH

Um resumo dos métodos utilizados para avaliação das vitaminas do complexo B e colina do LH estão descritos no **Quadro 7**.

Quadro 7. Métodos para avaliação das vitaminas do complexo B e colina no leite humano.

Vitaminas	**Método**	**Referência**
Tiamina livre, Tiamina monofosfato e tiamina difosfato	Cromatografia líquida de alta-eficiência acoplada com detecção de fluorescência (HPLC-FLD) série 1200 *Agilent*® (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EUA), após a derivatização da pré-coluna em seus ésteres de tiocromo. Apenas 100 µL de cada amostra foi usado, e desoxipiridina foi adicionada como um padrão interno para quantificação melhorada.	Hampel et al. (2016)
Riboflavina, FAD, FMN, nicotinamida, NAD, ácido pantotênico, piridoxal, piridoxina	Cromatografia líquida de ultra-eficiência associada à espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS). O sistema de classe UPLC I (Waters, Milford, MA, EUA) acoplado com um espectrômetro de massa SCIEX 4500TQ (*AB Sciex, Foster City*, CA, EUA) no modo de monitoramento de reação múltipla.	Hampel; York; Allen (2012)
Vitamina B12	Imunoensaio enzimático quimioluminiscente competitivo Siemens IMMULITE (*Siemens Healthcare*, Duluth, GA, EUA)	Hampel et al. (2014)
Frações totais da colina solúvel em água (colina livre, fosfocolina, glicerofosfocolina)	UPLC-MS /MS	Hampel et al. (2020)

Abreviaturas: FAD: Dinucleótideo de flavina e adenina (do inglês, *Flavin Adenine Dinucleotide)*; FMN: Flavina mononucleotídeo (do inglês, flavin mononucleotide); HPLC-FLD: *High-Performance Liquid Chromatography Fluorescence Detection*; UPLC-MS/MS: *Ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry*; NAD: Dinucleótideo de adenina e nicotinamida (do inglês, *Nicotinamide adenine dinucleotideo).*

Uma amostra de leite agrupada foi analisada como controle de qualidade (QC) com cada lote e análise. Os coeficientes de variação (CV) variaram de 3,3 a 7,9% para análises de tiamina, 5,4 a 26,5% para a análise simultânea de múltiplas vitaminas do complexo B, 1,3 a 5,9% para frações hidrossolúveis da colina e 8,5% para vitamina B12. Este estudo estimou o conteúdo total de tiamina, riboflavina, niacina, B6 e fração hidrossolúvel da colina e calculou a soma molar de suas respectivas frações. Nesta tese não foram avaliadas as concentrações das vitaminas biotina (B7) e folato (B9) no LH.

Foram avaliados valores implausíveis para micronutrientes do LH, adotando um critério que considerava o desenho do estudo longitudinal e a plausibilidade das concentrações observadas em cada visita durante a lactação (YANG; HUTCHEON, 2016). Especificamente, valores equivalentes a ± 4 desvios-padrão (DP) da média condicional esperada foram considerados *outliers*. Identificamos e excluímos *outliers* para riboflavina (entrevista 1, n = 1; entrevista 2, n = 1), niacina (entrevista 2, n = 1; entrevista 3, n = 2) e B6 (entrevista 2, n = 1).

6.4 Procedimentos de controle de qualidade dos dados

Diversos treinamentos foram realizados para a equipe de entrevistadores e um estudo piloto com o objetivo de garantir a qualidade dos dados coletados no estudo. Entre julho e outubro de 2016 foram realizados os treinamentos iniciais para a coleta de dados (com a finalidade de padronizar as entrevistas e reduzir o viés de informação), abordagem das participantes e coleta das amostras de LH (realizados em bancos de LH).

O estudo piloto ocorreu de novembro de 2016 a janeiro de 2017. Neste período, foram acompanhadas12 participantes, realizadas adequações/ correções nos procedimentos e protocolos e estabelecidos os fluxos de rotina. A coleta de dados foi iniciada em fevereiro de 2017 e concluída em janeiro de 2020.

Os questionários foram revisados diariamente, após sua aplicação, por outro entrevistador. Os dados eram enviados para o *Redcap*® somente após essa checagem. A cada quinze dias, o banco de dados era exportado do sistema com a finalidade de avaliação da qualidade dos dados e identificação de possíveis erros.

6.5 Covariáveis

Artigo 1

Um questionário estruturado foi administrado no início do estudo para coletar informações sociodemográficas e de saúde, incluindo: idade materna (anos), escolaridade (anos de estudo), cor da pele autorreferida (branca, negra, parda e outros), paridade (primíparas/multíparas), uso de suplementos contendo vitaminas do complexo B ou colina durante a gravidez (sim/não), tabagismo (sim/não) e ingestão de álcool (sim/não). O tipo de parto foi categorizado como vaginal ou cesáreo e a idade gestacional estimada pela primeira ultrassonografia realizada antes de 24ª semana de gestação ou, na sua ausência, pela data da última menstruação (n= 2). O aleitamento materno foi classificado em exclusivo e predominante, de acordo com as definições da OMS (OMS, 2008) (**Quadro 8**).

Quadro 8. Definição de aleitamento materno exclusivo e predominante

Tipos de Aleitamento Materno	**Definição**
Aleitamento materno exclusivo	Oferta somente leite humano, direto da mama ou ordenhado, ou leite humano de outras fontes, sem outros líquidos ou sólidos, com exceção de gotas ou xaropes (vitaminas, minerais ou medicamentos)
Aleitamento materno predominante	Oferta de leite humano predominantemente, além de água ou outras bebidas à base de água, sucos de frutas, fluídos rituais e gotas ou xaropes (vitaminas, minerais ou medicamentos)

Fonte: Organização Mundial de Saúde (2008)

O peso pré-gestacional autorrelatado e a altura medida na entrevista 2 foram usados para calcular o IMC pré-gestacional (em kg/m^2). As participantes foram classificadas de acordo com os pontos de corte da OMS (OMS, 1995).

Artigo 2

Um questionário estruturado foi administrado no início do estudo para coletar dados como idade materna (anos), escolaridade (anos de escolaridade), estado civil (com e sem parceiro) e paridade (primíparas / multíparas). O tipo de amamentação foi classificado de acordo com as definições da OMS (OMS, 2021). As concentrações séricas de folato (ng/mL) foram analisadas por ensaio imunoenzimático quimioluminescente em sistema automatizado UniCel DxI 800 (Beckman Coulter, Brea, EUA).

Os entrevistadores foram treinados para medir a altura em duplicata por meio de um estadiômetro (Altura Exata, Belo Horizonte, Brasil) na entrevista 2. Quando as medidas de altura diferiam em mais de 0,5 cm, uma terceira medida era realizada e a média das duas medidas mais semelhantes era usada. O peso pré-gestacional autorreferido foi utilizado para calcular o IMC pré-gestacional (kg/m²) e a classificação foi realizada de acordo com os pontos de corte estabelecidos pela OMS (OMS, 1995).

6.6 Análise estatística

Artigo 1

A distribuição das variáveis contínuas foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk, histogramas, medidas de assimetria e curtose. As variáveis categóricas foram avaliadas usado frequências absolutas e relativas e as variáveis contínuas com mediana e intervalo interquartil com a finalidade de descrever características maternas e as concentrações de vitaminas do complexo B e colina. A avaliação da plausibilidade da suposição de que os dados eram faltantes completamente ao acaso, foi realizada comparando as características das participantes com e sem amostras de leite usando os testes de Mann-Whitney, Qui-quadrado e exato de Fisher.

As concentrações das vitaminas do complexo B e colina no leite no período de 2-8 dias foram descritas diariamente pois esses dados são escassos. Além disso, estratificamos as concentrações destes micronutrientes nesta entrevista 1 em tercis derivados da distribuição da amostra do estudo.

As concentrações de vitaminas do complexo B e colina no leite nas entrevistas 1, 2 e 3 foram comparadas usando o teste de Skillings-Mack, pois a maioria dos micronutrientes no LH possuem distribuição assimétrica. Esta é uma alternativa ao teste de Friedman quando há dados ausentes (CHATFIELD; MANDER, 2009). As medianas de concentração dos micronutrientes no leite para cada par de entrevista no pós-parto e para comparar as medianas da ingestão alimentar materna desses micronutrientes e do consumo de alimentos de origem animal durante a gestação e a lactação foram comparadas com o teste dos postos sinalizados de Wilcoxon.

As correlações entre as variáveis maternas [IMC pré-gestacional, IMC atual nas entrevistas de seguimento e ingestão materna de alimentos de origem animal (carne bovina, peixe, frango, ovos e leite) durante a gestação e lactação] e as concentrações de vitaminas do complexo B e colina nas entrevistas 1, 2 e 3 foram investigadas usando o teste de correlação de Spearman.

As mudanças longitudinais nas concentrações das vitaminas do complexo B e colina do LH com base nos fatores maternos e nas concentrações de 2-8 dias pós-parto destas vitaminas foram avaliadas usando modelos lineares longitudinais de efeitos mistos. Estes modelos foram utilizados para estimar os coeficientes β e para fornecer uma estimativa combinada das associações entre os participantes ao longo do tempo. Para atender às suposições de normalidade nos modelos, as variáveis com distribuição assimétrica foram transformadas: inverso da raiz quadrada (riboflavina), log (niacina) e raiz quadrada (B6, B12). Nenhuma transformação foi necessária para tiamina, ácido pantotênico ou colina. No entanto, um termo linear e outro quadrático para o tempo (dias pós-parto) foram incluídos nos modelos da tiamina e colina para melhorar o ajuste. Para o ácido pantotênico, além dos termos linear e quadrático, também foi incluído um termo cúbico. Todos os modelos foram ajustados por fatores de confusão específicos (por exemplo, paridade, IMC pré-gestacional, consumo alimentar materno e uso de suplementos). Os efeitos principais foram considerados estatisticamente significativos quando $p<0,05$. Além disso, foram realizados gráficos de diagnóstico para verificar se houve alguma violação dos pressupostos dos modelos; gráficos de resíduos para avaliar a linearidade e homoscedasticidade; e gráficos quantil-quantil para verificar a normalidade dos resíduos.

Interações entre os fatores maternos e o tempo (dias pós-parto) foram testadas para avaliar se as mudanças nas concentrações das vitaminas do complexo B e colina do leite ao longo do tempo diferiam com base nos fatores maternos (IMC pré-gestacional, uso de suplementos de vitamina B

e colina durante a gestação, consumo alimentar materno durante a gestação e pós-parto, paridade, idade gestacional no parto e tipo de parto). A significância estatística dos termos de interação foi fixada em $p<0,10$, considerando o limitado poder para detectar interações em amostra de tamanho pequeno conforme recomendado anteriormente (ALTMAN; BLAND, 2003). Gráficos de interação contendo a predição longitudinal e intervalos de confiança de 95% (IC) foram construídos para ilustrar as trajetórias das vitaminas do complexo B e colina no leite, de acordo com o tercil das concentrações desses micronutrientes na entrevista 1 e fatores maternos. As análises estatísticas foram realizadas com o software Stata Data Analysis and Statistical Software (STATA, StataCorp, College Station, TX, EUA), versão 15.0 e pacote de software estatístico R, versão 3.6.0 (The R Foundation, Viena, Áustria).

Artigo 2

A distribuição das variáveis contínuas foi avaliada por meio de histogramas e medidas de assimetria e curtose. As características maternas, biomarcadores sanguíneos e concentração de B-12 no LH foram descritas por meio de frequências absolutas e relativas (variáveis categóricas) e mediana e intervalo interquartílico (variáveis contínuas). As características das participantes com e sem amostras de leite foram comparadas usando os testes de Mann-Whitney, Qui-quadrado e exato de Fisher.

O teste de correlação de Spearman foi usado para investigar as correlações entre as concentrações séricas de vitamina B-12 e homocisteína durante a gestação e lactação e as concentrações de vitamina B-12 do LH nas entrevistas 1 e 2. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar as concentrações de B-12 no LH entre participantes com ou sem sintomas depressivos e de ansiedade.

Modelos de regressão linear não ajustados e ajustados foram realizados para avaliar a associação entre os escores de sintomas depressivos e de ansiedade na linha de base (exposição) e concentrações séricas de vitamina B-12 e homocisteína (desfechos) nas entrevistas 1 e 2. A outra direção dessa relação também foi investigada com uma regressão linear para estimar a associação entre as concentrações séricas de vitamina B-12 e de homocisteína na linha de base (exposição) e os escores de sintomas depressivos e ansiedade na entrevista 2 (desfecho). Adicionalmente, um modelo de regressão linear foi usado para estimar a associação entre os escores de sintomas depressivos e de ansiedade (exposição) e as concentrações de vitamina B-12 no LH (desfecho).

Considerando que as concentrações séricas de B-12 e homocisteína materna e as concentrações de B-12 no LH apresentaram distribuição assimétrica, os modelos de regressão foram conduzidos usando transformação logarítmica natural e, em seguida, expressos como uma diferença percentual. Para avaliar a homogeneidade de variância e normalidade, os resíduos de todos os modelos de regressão foram plotados e avaliados. Além disso, realizamos análises de sensibilidade incluindo apenas bebês amamentados exclusivamente para avaliar a associação entre os escores de sintomas depressivos e de ansiedade e as concentrações de vitamina B-12 no LH, considerando que alterações na saúde mental podem afetar o modo de amamentar.

Todos os modelos foram ajustados por fatores de confusão específicos, selecionados de acordo com a plausibilidade biológica e conhecimento prévio. As associações foram consideradas estatisticamente significativas quando p-valor <0,05. As análises estatísticas foram realizadas usando software STATA versão 15.0 (StataCorp, College Station, TX, EUA) e o R versão 4.0.3 (The R Foundation, Viena, Áustria).

6.7 Aspectos éticos

O estudo de coorte ao qual esta tese está vinculada foi previamente aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Maternidade Escola da UFRJ (CAAE: 49218115.0.0000.5275) e pelo CEP da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil do Rio de Janeiro (CAAE: 49218115.0.3001.5279). O estudo encontra-se de acordo com o que está disposto na Resolução nº 466/2012 (**ANEXOS 2 e 3**).

O TCLE foi explicado para a participante no momento da captação (**ANEXO 4**). Aquelas que aceitaram participar do estudo assinaram uma via desse documento que foi entregue ao entrevistador e receberam outra via para si, com informações sobre a pesquisa e contato do pesquisador principal.

O projeto ofereceu para todas as gestantes em atendimento pré-natal na Clínica da Família, independente da participação ou não na pesquisa, atividades de orientação para AM e alimentação complementar.

7 RESULTADOS

7.1 Artigo 1 (publicado) (**ANEXO 5**)

BATALHA MA. *et al.* Fatores associados às mudanças longitudinais nas concentrações das vitaminas do complexo B e colina do leite humano, **The American Journal of Clinical Nutrition**, 2021.

BATALHA MA. *et al.* Factors associated with longitudinal changes in B-vitamin and choline concentrations of human milk, **The American Journal of Clinical Nutrition**, 2021.

RESUMO

Introdução: Pouco se sabe sobre as associações entre os fatores maternos e as concentrações de vitaminas do complexo B e colina precoces no leite e as trajetórias dessas vitaminas durante a lactação. **Objetivos:** Neste estudo gerador de hipóteses, modelamos a associação entre fatores maternos e infantis e mudanças longitudinais nas concentrações de vitaminas do complexo B e colina no leite ao longo da lactação. **Métodos:** Cem mulheres foram estudadas em uma coorte de nascimentos prospectiva e amostras de leite de 52 mulheres foram coletadas aos 2–8 dias, 76 mulheres aos 28–50 dias e 42 mulheres aos 88–119 dias pós-parto. A ingestão alimentar materna durante a gestação e a lactação foi avaliada por um QFA. Modelos lineares de efeitos mistos com termos de interação foram usados para avaliar as mudanças nas concentrações das vitaminas do complexo B e colina no leite ao longo do tempo, com base em fatores maternos e nas concentrações precoces do pós-parto destes micronutrientes. **Resultados:** As mulheres com maiores concentrações no leite no pós-parto precoce de niacina ($\beta_{interação}$ = −0,02; EP = 0,00; p-valor <0,001), ácido pantotênico ($\beta_{interação}$ = −0,10; EP = 2,56; p-valor <0,001), vitamina B-12 ($\beta_{interação}$ = −0,10; EP = 0,03; p-valor <0,001) e colina ($\beta_{interação}$ = −0,90; EP = 0,18; p-valor <0,001) exibiram uma diminuição em suas concentrações ao longo da lactação. As participantes com sobrepeso e obesidade pré-gestacional experimentaram aumento nas concentrações de vitamina B-12 no leite ao longo do tempo ($\beta_{interação}$ = 0,04; EP = 0,02; p-valor = 0,06). Em contraste, uma diminuição na concentração de vitamina B-12 foi observada entre mulheres com ingestão de vitamina B-12 abaixo da RDA durante a gestação ($\beta_{interação}$ = −0,08; EP = 0,05; p-valor= 0,07). As mulheres com ingestão de niacina abaixo da RDA durante a lactação experimentaram aumento nas concentrações de leite ao longo do tempo ($\beta_{interação}$ = 0,01; EP = 0,01; p-valor= 0,03). A idade gestacional ao nascimento > 40 semanas foi associada ao aumento na concentração de colina no leite durante a lactação ($\beta_{interação}$ = 0,54; EP = 0,16; p-valor <0,01). **Conclusões:** Mudanças nas concentrações de vitaminas do complexo B e colina no leite humano ao longo do tempo podem estar associadas às concentrações iniciais desses micronutrientes no leite, IMC pré-gestacional materno, ingestão alimentar e idade gestacional no parto.

Palavras-chave: ingestão materna de micronutrientes, concentrações de micronutrientes do leite humano, mudanças nas concentrações de micronutrientes do leite humano, vitaminas B, colina, gravidez, lactação.

ABSTRACT

Background: Little is known regarding the associations between maternal factors and B-vitamin and choline concentrations in early milk and the trajectories of these vitamins during lactation. **Objectives:** In this hypothesis-generating study, we modeled the association between maternal and offspring factors and longitudinal changes in milk B-vitamin and choline concentrations throughout lactation. **Methods:** A hundred women were studied in a prospective birth cohort and milk samples from 52 women were collected at 2–8 d, 76 women at 28–50 d, and 42 women at 88–119 d postpartum. Maternal dietary intake during pregnancy and lactation was assessed by an FFQ. Linear mixed-effects models with interaction terms were used to evaluate changes in milk B-vitamin and choline concentrations over time based on maternal factors and the early postpartum concentrations of these micronutrients. **Results:** The women with higher early postpartum milk concentrations of niacin ($\beta_{interaction}$= −0.02; SE = 0.00; P < 0.001), pantothenic acid ($\beta_{interaction}$= −0.10; SE=2.56; P<0.001), vitamin B-12 ($\beta_{interaction}$ = −0.10; SE = 0.03; P< 0.001), and choline ($\beta_{interaction}$= −0.90; SE = 0.18; P< 0.001) exhibited a decrease in their concentrations throughout lactation. The participants with overweight and obesity prepregnancy experienced an increase in milk vitamin B-12 concentrations over time ($\beta_{interaction}$= 0.04; SE = 0.02; P= 0.06). In contrast, a decrease in vitamin B-12 concentration was observed among women with vitamin B-12 intake below the RDA during pregnancy ($\beta_{interaction}$= −0.08; SE = 0.05; P= 0.07). The women with niacin intake below the RDA during lactation experienced an increase in milk concentrations over time ($\beta_{interaction}$= 0.01; SE = 0.01; P = 0.03). A gestational age at birth >40 wk was associated with an increase in milk choline concentration throughout lactation ($\beta_{interaction}$= 0.54; SE = 0.16; P < 0.01). **Conclusions:** Changes in B-vitamin and choline concentrations in human milk over time may be associated with the early concentrations of these micronutrients in milk, maternal prepregnancy BMI, dietary intake, and gestational age at delivery.

Keywords: maternal micronutrient intakes, human milk micronutrient concentrations, changes in human milk micronutrient concentrations, B vitamins, choline, pregnancy, lactation.

Introduction

The benefits of breastfeeding for both mothers and infants are well described in the literature (1). One of the key breastfeeding recommendations of the WHO is for infants to be exclusively breastfed for the first 6 mo of life (2, 3). Consequently, there is a need to understand the adequacy of human milk composition because it serves as the only source of nutrients for many children in their first 6 mo of life (4).

B vitamins and choline are classified as group I micronutrients in human milk because they are all affected by maternal status. Therefore, they are subject to decreased concentrations in maternal deficiency cases. Thus, they are of great public health interest. Folate, on the other hand, is classified as a group II micronutrient and is unaffected by maternal status or intake (5).

B vitamins are organic compounds not synthesized by the human body and must be provided mainly by dietary intake (6); these compounds can also be biosynthesized by microbiota living in the gastrointestinal tract in limited amounts (7). Exceptions are niacin, which can be synthesized from tryptophan (8, 9), and choline, which is produced in small quantities in the liver (10). B vitamins and choline act as cofactors and coenzymes in several metabolic reactions, such as the citric acid cycle and one-carbon metabolism. They are involved in brain function and are required for an infant's health and development (6, 11, 12).

For some micronutrients, the concentrations increase during lactation, whereas others decrease or remain stable, and for some, the concentration may increase in some periods but decrease during others (13). Studies have documented low B-vitamin concentrations in milk based on maternal biomarkers of its status or inadequate maternal dietary intake (14, 15). These studies have concluded that maternal deficiency of these vitamins (especially riboflavin and vitamin B-12) appears to be higher in populations where the consumption of animal-source foods (ASFs) tends to be lower or where women consume a diet of poor quality (14). In addition to maternal biomarker indicators of vitamin status, diet, and supplementation intake, preterm delivery has been associated with milk B-vitamin and choline concentrations (16), but the reported results are still inconclusive. There are very few longitudinal studies and none that have assessed how maternal factors, including the mother's nutritional status and milk. B-vitamin concentrations during the early stages of lactation, could modify their time-related changes throughout lactation.

The primary aim of this study was to assess the association between maternal nutritional status and milk B-vitamin and choline concentrations throughout lactation. The topic is relevant considering the lack of longitudinal studies combined with a dearth of investigations that have used proper human milk sampling procedures and analytical methods. The second aim was to determine whether the concentrations of these nutrients in milk during early lactation and maternal dietary intake and other factors could change their time-dependent trajectories during lactation.

Methods

Study design and participants

This study was part of a prospective birth cohort with a baseline between 28 and 35 weeks of gestation and 5 follow-up visits at several time points (TPs) postpartum: 2–8 d (TP1), 28–50 d (TP2), 88–119 d (TP3), 6 mo (TP4), and 12 mo (TP5). A nonprobabilistic sample of 147 women and their infants was followed. We analyzed data from a subsample of 100 women who provided milk samples for ≥1 of the following TPs: TP1, TP2, or TP3 (Figure 1).

The women were recruited from a public health care center located in a lower-income community in Rio de Janeiro, Brazil, and were followed between January 2017 and January 2020. Eligibility criteria comprised recruitment between 28 and 35 weeks of gestation, 18–40 y of age, singleton pregnancy, no known infectious or chronic noncommunicable diseases (except obesity), and residence in the catchment area of the public health center. The women were excluded if they developed gestational diabetes or pre-eclampsia or had a stillbirth (n = 3).

Ethics

The Research Ethics Committee of the Municipal Health Secretary and Civil Defense of the State of Rio de Janeiro (Protocol number: 49218115.0.0000.5275) and the Maternity School of Rio de Janeiro Federal University (Protocol number: 49218115.0.0000.5275) approved the present study. Written informed consent from all the participants was obtained freely and spontaneously.

Human milk collection and B vitamin and choline analysis

Women breastfeeding on demand were instructed to collect milk samples at the TP1, TP2, and TP3 visits in a public health care center following procedures established by the Brazilian

Network of Human Milk Banks protocol (17). Briefly, the participants collected milk, preferably in the morning after breakfast (until ~10:00), because the concentrations of these vitamins in milk exhibit little or no diurnal variation (16). The milk samples were collected from the same breast through hand expression, considering that a pump could represent a potential risk of contamination. For the aim of this study, it was not necessary to clean the breast. Before starting the collection, the participants were asked to wash their hands and put on masks to protect their face and head coverings to avoid possible sample contamination during the process. The trained interviewer also used the same hygiene procedures because, if necessary, they could help the participant with the milk sample extraction using nitrile gloves (18).

A total of 5 mL milk was collected from each participant at TP1 and 17 mL at TP2 and TP3. The samples were expressed directly into 50-mL sterile, ribonuclease-free, deoxyribonuclease-free, nonpyrogenic tubes. Although the breast was not fully emptied, previous studies have shown that the concentrations of water-soluble vitamins in milk remain relatively stable during the feeding episode (hind or foremilk) (16). The samples were processed immediately after collection. They were homogenized and divided into aliquots aseptically (18). One aliquot of 1 mL at each of the visits was used for B vitamin and choline analyses. The samples were frozen at -20^0C and then transported in a temperature-controlled box (-1^0C to -5^0C) to Rio de Janeiro Federal University and stored at -80^0C. The frozen samples were shipped on dry ice to the USDA/Agricultural Research Service Western Human Nutrition Research Center, Davis, CA, for analysis. Milk vitamin analyses were carried out as follows: free thiamin, thiamin monophosphate, and thiamin diphosphate were analyzed by an Agilent 1200 HPLC series coupled with fluorescence detection after precolumn derivatization to their thiochrome esters as previously reported (19). The following modification was performed: only 100 μL of each sample was used, and deoxypyridine was added as an internal standard for improved quantification. Multiple B vitamins (riboflavin, FAD, FMN, nicotinamide, NAD, pantothenic acid, pyridoxal, pyridoxine, and biotin) were analyzed by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLCMS/MS) (Waters UPLC I-Class system coupled with a SCIEX 4500TQ mass spectrometer in multiple reaction monitoring mode) as previously recommended (20). A 40-μL sample volume was subjected to the described sample preparation. Additional analytes were added to the detection method. Vitamin B-12 was analyzed using the Siemens IMMULITE competitive protein binding chemiluminescence assay (21). Water-soluble cholines (free choline, phosphocholine,

glycerophosphocholine) were analyzed as aforementioned using the same UPLC-MS/MS system (22). A pooled milk sample was analyzed as a quality control with every batch and analysis. CVs ranged from 3.3% to 7.9% for thiamin analyses, 5.4% to 26.5% for the simultaneous analysis of multiple B vitamins, 1.3% to 5.9% for water-soluble choline, and 8.5% for vitamin B-12. This study estimated the total content of thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B-6, and water-soluble choline and calculated the molar sum of their respective vitamers.

We evaluated implausible values for micronutrients of milk, adopting a criterion that considered the longitudinal study design and the plausibility of observing the concentrations at other TPs during lactation (23). Specifically, values that were ±4 SD from the expected conditional mean were considered outliers. We identified and excluded outliers for riboflavin (TP1, n = 1; TP2, n = 1), niacin (TP2, n = 1; TP3, n = 2), and vitamin B-6 (TP2, n = 1).

Assessment of dietary intake

Two semiquantitative FFQs were used to estimate maternal dietary intake. The first was administered between the 28th and 35th weeks of gestation to evaluate the usual intake during pregnancy. This instrument consisted of 85 food items and was previously validated in Brazil for estimating intakes of nutrients throughout gestation (24). The second FFQ was administered 6 mo postpartum to evaluate the usual maternal intake during the first 6 postpartum months. It consisted of 114 food items and has also been validated for estimating intakes of nutrients among adult Brazilian women (25). Food-frequency intake was reported as daily frequency. The daily portion in grams of each food item was calculated by multiplying the portion size by the daily frequency.

Daily ASF, nutrient, and energy intakes were estimated using the Brazilian Food-Composition Table (TACO) (26) and Tables of Nutritional Composition of Foods Consumed in Brazil from the Household Budget Survey (2008–2009) (27). The National Nutrient Database for Standard Reference release 28 (USDA) (28) was used for food items not found in the primary databases. We excluded women who had implausible energy intake (<600 and >6000 kcal/d) during pregnancy (n = 5) and lactation (n = 1).

The FFQ items related to cow/bovine red meat, fish, chicken, eggs, and milk (whole and skim) were summed in grams to create group variables that represented ASF as the primary food

source of B vitamins. These analyses were adjusted for total daily energy intake using the residual method (29).

Both Harmonized Average Requirements (H-ARs) and RDAs are useful in assessing dietary intakes and their relation to human milk nutrient concentrations. H-ARs are recommended for evaluating inadequate dietary intakes of populations. In contrast, RDAs are used in assessing intake and meal planning for individuals, although RDA-level intakes are higher than the requirements of most individuals in the population. Similarly, for nutrients lacking an RDA (e.g., pantothenic acid and choline), Adequate Intake (AI) is utilized in individual dietary assessment and planning. In our analysis, H-ARs were used to estimate the prevalence of inadequate micronutrient intake during pregnancy and lactation. Pregnancy and postpartum dietary intakes relative to RDAs/AIs were ultimately used to model longitudinal changes in human milk concentrations; H-ARs were also considered in this approach, given their recommended usage in assessing adequacy. However, the low frequency of inadequate intakes, as determined by comparing the H-ARs, inhibited model convergence. Given the paucity of evidence assessing maternal intake in relation to longitudinal changes in human milk nutrient concentrations, we present comparisons relative to the RDAs/AIs to spur future experimental evidence in this field, particularly given the lack of direct data informing RDAs for pregnancy and lactation.

Sociodemographic, health, and anthropometric data collection

A structured questionnaire was administered at baseline to collect data such as maternal age (y), education (schooling years), self-reported skin color (white, black, mixed, and others), parity (primiparous/multiparous), use of supplements containing B vitamins or choline during pregnancy (yes/no), smoking (yes/no), and alcohol intake (yes/no). The delivery mode was categorized as vaginal or cesarean delivery, and gestational age was estimated using the first ultrasonography or the date of the last menstrual period when no ultrasonography was conducted before 24 weeks of gestation (n=2). Breastfeeding status was classified according to the WHO definitions (30).

The interviewers were trained to measure weight using digital scales (Seca 704) and height in duplicate using a stadiometer (Altura Exata). When the measurements of height differed by >0.5 cm, a third measurement was performed, and the mean of the 2 more similar measurements was used. The self-reported prepregnancy weight and measured height (at 28–50 d postpartum) were

used to calculate the prepregnancy BMI (in kg/m2); women were classified according to the WHO cutoffs (31) as underweight (<18.5), normal weight (≥18.5 and <25.0), overweight (≥25.0 and <30.0), or obese (≥30).

Statistical analyses

The distribution of continuous variables was assessed using the Shapiro–Wilk test, histograms, kurtosis, and skewness measurements. We used absolute (n) and relative frequencies (%) for categorical variables and median and IQR for continuous variables to describe maternal characteristics and B vitamin concentrations. To evaluate the plausibility of the assumption that data were missing completely at random, we compared the characteristics of women with and without milk samples using the Mann–Whitney U test, chi-square test, and Fisher's exact test.

Considering that data on milk B vitamin and choline concentrations during the early postpartum period, i.e., 2–8 d, are very scarce, we reported these micronutrient concentrations daily. In addition, we stratified the milk B-vitamin and choline concentrations at 2–8 d postpartum into tertiles derived from the study sample's distribution.

Owing to the nonnormal distribution of most micronutrients in human milk, the Skillings–Mack test was performed to compare the milk B-vitamin and choline concentrations across TP1, TP2, and TP3. This is an alternative to Friedman's test when there are missing data (32). Wilcoxon's matched-pairs signed-rank test was performed to compare each pair of visits for both micronutrients in milk and medians of daily maternal dietary intake of these micronutrients and their ASFs during pregnancy and lactation.

Spearman's rank correlation test was performed to investigate correlations between maternal variables [prepregnancy BMI, current BMI at follow-up visits, and maternal intake of ASFs (cow/bovine red meat, fish, chicken, eggs, and milk) during pregnancy and lactation] and B vitamin and choline concentrations at TP1, TP2, and TP3.

Longitudinal linear mixed-effects models were performed to estimate β coefficients and to provide a combined estimate of the associations between participants and within participants over time. To meet the assumptions of normality in the models, skewed variables were inverse square root (riboflavin), log (niacin), and square root (vitamin B-6, vitamin B-12) transformed. No

transformations were needed for thiamin, pantothenic acid, or choline. However, to best fit these models, a linear and quadratic term for time, i.e., postpartum days, was included for thiamin and choline. For pantothenic acid, a cubic term was also included in addition to a linear and quadratic term. All the models were adjusted by specific confounders (e.g., parity, prepregnancy BMI, maternal intake, and use of supplements). The main effects were considered statistically significant when P values were <0.05. Furthermore, we performed diagnostic plots to check for violation of the model's assumptions: residual plots were used to assess the linearity and homoscedasticity. Quantile-quantile plots were used to check the normality of the residuals and random effects.

Interactions between maternal factors and time (postpartum days) were tested to evaluate whether the changes in milk B vitamin and choline concentrations over time differed based on maternal factors (prepregnancy BMI, use of B-vitamin and choline supplements during pregnancy, dietary intake during pregnancy and postpartum, parity, gestational age at delivery, and mode of delivery). Considering that there was limited power to detect interactions, statistical significance for interaction terms was considered when the P values were <0.10, as previously recommended (33). Interaction plots containing longitudinal prediction and 95% CIs were constructed to depict B-vitamin and choline time trajectories in milk according to the early stage (2–8 d) concentrations of these micronutrients and maternal factors. Only statistically significant results are presented using interaction plots and supplemental tables. Statistical analyses were performed using the Stata data analysis and statistical software (StataCorp), version 15.0 and the R statistical software package, version 3.6.0 (The R Foundation).

Results

Study design and participants

A total of 147 women were recruited. However, 47 did not collect milk samples. Thus, a subsample of 100 women who provided samples for ≥1 TP was followed: TP1 (n = 52), TP2 (n = 76), and TP3 (n = 42) (**Figure 1**).

Sixty-eight percent of the women with milk samples were <30 y old, 32% were classified with overweight, and 14% were classified with obesity before pregnancy (Table 1). The women

with (n = 100) and without (n = 47) milk samples did not differ according to their maternal and sociodemographic characteristics (**Supplemental Table 1**).

B-vitamin and choline intake during pregnancy and lactation

Maternal daily intakes of thiamin, niacin, pantothenic acid, vitamin B-6, choline, fish, and eggs were significantly higher during lactation than during pregnancy. Dietary inadequacies declined from pregnancy to lactation for thiamin, niacin, vitamin B-6, and choline. The prevalence of inadequate intake was highest for choline (52.2%) during pregnancy. The prevalence of inadequate riboflavin intake during lactation was 35.5% (**Table 2**).

Milk B-vitamin and choline changes during lactation and correlation with maternal nutritional status

TP1—2–8 d postpartum.

The median concentration of thiamin in milk was higher between 6 and 8 d than between 3 and 5 d. Milk riboflavin concentrations did not vary between day 5 and day 8, niacin decreased from day 2 until day 4, and vitamin B-12 increased until day 4 and remained stable thereafter. Pantothenic acid and choline increased between day 3 and day 7 (**Supplemental Figure 1A**).

TP1—2–8 d postpartum, TP2—28–50 d postpartum, and TP3—88–119 d postpartum.

The median concentrations of thiamin and vitamin B-6 varied significantly throughout the study period; in contrast, riboflavin, vitamin B-12, and choline did not differ among the postpartum visits. Niacin concentrations differed when comparing TP1 with TP2 and TP2 with TP3 but not TP1 with TP3. Pantothenic acid median concentrations differed only between TP1 and TP2 (**Table 3**, **Supplemental Figure 1B**). Although not consistently achieving our statistical significance threshold, it is notable that the magnitudes of the median concentrations of thiamin, niacin, pantothenic acid, and choline were higher at TP2 than at TP1 and TP3 (Table 3).

Correlations between milk micronutrient concentrations and maternal nutritional status.

The milk riboflavin concentrations were positively and significantly correlated with red meat intake during lactation (TP1: $\rho = 0.43$); pantothenic acid concentrations were positively correlated with cow milk intake (TP3: $\rho = 0.49$) and inversely correlated with egg intake during pregnancy (TP3: $\rho = -0.39$). Milk vitamin B-6 concentrations were inversely correlated with

prepregnancy BMI (TP1: ρ = −0.41; TP2: ρ = −0.27) and current BMI at TP2 and TP3 (TP2: ρ = −0.25; TP3: ρ = −0.32) and positively correlated with intake of red meat during lactation (TP1: ρ = 0.46). Milk vitamin B-12 was inversely correlated with prepregnancy BMI (TP1: ρ = −0.31) and positively correlated with cow milk intake during lactation (TP1: ρ = 0.43). Furthermore, milk choline concentrations were inversely correlated with current BMI at TP2 (TP2: ρ = −0.32), red meat intake during pregnancy (TP1: ρ =−0.31), and chicken intake during lactation (TP1: ρ=−0.45) (**Supplemental Figure 2**).

Maternal factors and B-vitamin and choline time trajectories 2–119 d postpartum

There were significant variations in micronutrient concentrations over time: the concentration of vitamin B-6 increased throughout the first 119 d postpartum; those of thiamin, pantothenic acid, and choline increased in the first 40–60 d postpartum then decreased until 119 d; and those of riboflavin, niacin, and vitamin B-12 remained stable over 119 d postpartum (**Supplemental Figure 3**). The women in the upper tertile for milk niacin ($\beta_{interaction}$= −0.02; SE = 0.00; P < 0.001), pantothenic acid ($\beta_{interaction}$= −0.10; SE=2.56; P<0.001), vitamin B-12 ($\beta_{interaction}$ −0.10; SE = 0.03; P < 0.001), and choline ($\beta_{interaction}$= −0.90; SE = 0.18; P < 0.001) concentrations at TP1 experienced a significant decrease in milk concentrations of these micronutrients throughout lactation compared with the women with corresponding concentrations in the lower tertiles (**Figure 2**, **Supplemental Table 2**). The participants with overweight and obesity prepregnancy had a significant increase in milk vitamin B-12 concentrations throughout lactation compared with the women with a normal prepregnancy weight and those who were underweight prepregnancy ($\beta_{interaction}$= 0.04; SE = 0.02; P = 0.06) (**Figure 3**, **Supplemental Table 3**). The women with vitamin B-12 intake below the RDA during pregnancy experienced a more pronounced decrease in milk vitamin B-12 concentrations throughout lactation than the women with vitamin B-12 intake above the RDA during pregnancy ($\beta_{interaction}$= −0.08; SE = 0.05; P = 0.07) (**Figure 4**, **Supplemental Table 4**). The participants with niacin intake below the RDA during lactation had an increase in milk niacin concentrations throughout the postpartum period compared with the women with niacin intake above the RDA ($\beta_{interaction}$= 0.01; SE = 0.01; P = 0.03) (**Figure 5**, **Supplemental Table 5**). The women who were at 40–42 weeks of gestation at delivery showed increases in choline concentrations throughout lactation compared with the women who delivered at 37–39 weeks of gestation ($\beta_{interaction}$= 0.54; SE = 0.16; P < 0.01) (**Supplemental Table 6**). The use of supplements

during pregnancy, parity, and delivery mode were not associated with changes in B-vitamin or choline concentrations throughout the postpartum period (data not shown).

Discussion

This study revealed that prepregnancy BMI, pregnancy or postpartum dietary intake, gestational age at delivery, and early postpartum milk concentrations of B vitamins and choline were associated with changes in milk micronutrient concentrations throughout lactation. We identified correlations of micronutrients in milk with prepregnancy and current BMI and maternal ASF intake at different TPs. These findings may have clinical and public health implications related to child health, growth, and development (14).

During the first 119 d postpartum, thiamin, pantothenic acid, and choline concentrations in milk increased, followed by a decline. Riboflavin, niacin, and vitamin B-12 concentrations were stable, and we revealed an increase in the vitamin B-6 concentration. Our findings for thiamin, riboflavin, vitamin B-6, vitamin B-12, and choline are consistent with those from a systematic literature review (13). A Chinese cross-sectional study with 1778 human milk samples showed that some B-vitamin concentrations in colostrum were lower than those in mature milk (35). Their findings agree with our results for thiamin, riboflavin, pantothenic acid, vitamin B-6, and choline.

Interestingly, the women in the current study with higher concentrations of niacin, pantothenic acid, vitamin B-12, and choline in early lactation had a significant decrease in these vitamins at later lactation stages compared with the women who started with lower concentrations. Because one of the main factors regulating milk production is infant demand (36, 37), this finding could point toward a physiological mechanism. Infants may send signals to their mothers during breastfeeding, adjusting the milk composition to their requirements.

The literature discussing the relations between maternal dietary intake and micronutrient concentrations in human milk remains inconsistent (38, 39). In our study, the women with vitamin B-12 intake below the RDA during pregnancy showed a more pronounced decrease in milk vitamin B-12 concentrations during lactation. Maternal intake below the RDAs may have generated a vitamin deficiency in these participants and, consequently, may have contributed to reduced milk

concentrations. Other studies that included participants with vitamin B-12 deficiency related to diet also reported a decline in the milk concentrations of this vitamin (40, 41).

We also found that women with niacin intake below the RDA during lactation had an increase in concentrations of this vitamin during lactation compared with women with niacin intake above the RDA. Although this is an unexpected result, it is important to note that the milk total niacin concentrations are only represented by 2 niacin forms and not all of the different forms available in the milk. Therefore, the milk total niacin concentrations cannot be deduced from the results here. The forms of niacin not captured here could alter the trajectories and associations for this vitamin. Moreover, niacin is obtained from food and bacteria and synthesized in the human body from the essential amino acid tryptophan (8), which could affect the outcome of the analyses conducted here.

ASFs are a source of bioavailable micronutrients (42) and almost the sole dietary source of vitamin B-12 (43). Maternal red meat intake during lactation was positively correlated with milk riboflavin and vitamin B-6 and that of cow milk was positively correlated with vitamin B-12 and pantothenic acid in milk. Given that ASF is the main source of these vitamins, our findings are not surprising. A study of lactating Kenyan women found no association between recent ASF consumption and vitamin B-12 concentrations in milk. However, they evaluated dietary intake using only a single 24-h recall (44). We also found an unexpected inverse correlation between maternal intake of red meat and chicken and milk choline. In addition to ASFs, nuts, broccoli, beans, red potato, and white rice are also important sources of this micronutrient (45). Nevertheless, a study that evaluated the concentrations of choline in human milk and maternal blood showed that not only the total choline intake but also single nucleotide polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene could influence these concentrations by changing the choline requirements and the relation between choline intake and its concentrations in human milk (46).

In our study, vitamin B-6, vitamin B-12, and choline concentrations in milk were inversely correlated with prepregnancy and/or current BMI at the follow-up visits. Only a few studies have previously examined this relation. A study with 500 Tanzanian women showed that a BMI > 22 during pregnancy doubled the odds of having inadequate milk vitamin B-12 concentrations (47). Another study with Chinese women also showed an inverse association between current BMI and

thiamin and vitamin B-6 in their milk (35). Hence, diet could be a key factor in this relation, considering that BMI could reflect the quality of the diet. A study with Canadian adults showed inverse correlations between dietary choline intake and obesity measurements, including BMI (48). It is also possible that inflammatory status related to obesity could induce changes in B-vitamin and choline physiology; indeed, studies have documented associations between maternal inflammation and lower plasma concentrations of vitamin B-6 (49, 50). Genetics could also play a role in these relations. The mRNA expression of peroxisome proliferator–activated receptor-γ (PPARγ) target genes regulating adipogenesis could also be regulated by vitamin B-6 (51). Lower vitamin B- 12 concentrations in people with obesity could be related to genetic variations in the fat mass and obesity-associated protein (FTO) locus (52). We found an increase in the concentration of vitamin B-12 during lactation among women with prepregnancy overweight and obesity. Higher prepregnancy BMI may reflect low blood maternal micronutrient concentrations, which may be reflected in lower concentrations in milk at the beginning of lactation, e.g., the inverse correlation between prepregnancy BMI and milk vitamin B-12 concentrations previously shown at TP1. After that, the increase in vitamin B-12 concentration in milk over time may reflect current maternal nutritional status, which could be improved during lactation.

We observed an increase in milk choline concentrations through lactation for women with >40 weeks of gestation at delivery. The literature discussing the association between gestational age at delivery of full-term infants and milk choline concentrations is still limited, with only a few studies comparing the milk concentration of this nutrient between full and preterm births. During pregnancy, B-vitamin and choline supplements did not influence the micronutrient time trajectories, most likely because many women who used a supplement (n = 17) reported doing so only occasionally. They mainly used vitamin B-6 supplements owing to their potential benefits for nausea reduction. In addition, only 3 women reported using supplements during lactation; owing to the small sample, they were not included in the specific model.

This study's major strengths were the longitudinal design and the inclusion of samples at early stages of lactation, enabling the analyses of time trajectories of these micronutrient concentrations in milk. In addition, the micronutrient concentrations were measured with the most accurate methods available to date. Furthermore, we collected the maternal usual dietary intake at 2 time points (pregnancy and lactation) and recorded supplements used during pregnancy to better

explain the implications of maternal diet for B-vitamin and choline concentrations in milk. Lastly, even though our sample size could be considered relatively low, the study was longitudinal. The statistical method used did not completely exclude women with partially missing values from the analyses, i.e., women who had ≥1 measure of milk were included in the analyses.

There are some study limitations to be considered. First, we did not evaluate maternal micronutrient biomarker status in blood or polymorphisms in genes that may predispose individuals to different micronutrient requirements. Second, data collection varied by ≤1 mo at TP2 and TP3, and the prevalence of different breastfeeding statuses varied between mother–infant pairs. Notwithstanding this, the prevalence of exclusive or predominant breastfeeding was 92.3%, 76.3%, and 64.3% at TP1, TP2, and TP3, respectively. However, few data exist describing how the nature of feeding or variation in the timing of introducing mixed feeding could affect the concentration of these micronutrients in milk during lactation. This study evaluated only the total water-soluble forms of choline, representing ∼80% of choline in human milk (53). However, we acknowledge that the changes over time for lipid-soluble forms may have different determinants. These factors could counterbalance the determinants associated with the water-soluble milk choline forms shown in the present study. Third, we recruited women at only 1 clinic. Hence, the external validity of our findings needs to be interpreted with caution. In addition, this study is hypothesis-generating. Consequently, it was not powered to consider advanced multivariate models.

In conclusion, we found that concentrations in the early days of lactation, gestational age at delivery, and maternal nutritional status may be associated with the time trajectories of milk B vitamin and choline concentrations during the first 3 mo of lactation. More longitudinal and interventional studies are needed to better understand how maternal factors directly or indirectly (e.g., mediated by the milk concentration during the early days) modify the trajectories of these critical micronutrients in human milk throughout lactation and affect infant and child status, health, and development.

References

1. Victora CG, Bahl R, Barros AJD, França GVA, Horton S, Krasevec J, Murch S, Sankar MJ, Walker N, Rollins NC. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. Lancet 2016; 387:475–90.
2. World Health Organization. The optimal duration of exclusive breastfeeding. Report of an expert consultation. Geneva, Switzerland: WHO; 2001.
3. Pérez-Escamilla R, Buccini GS, Segura-Pérez S, Piwoz E. Perspective: should exclusive breastfeeding still be recommended for 6months? Adv Nutr 2019;10(6):931–43.
4. Allen LH, Hampel D. Human milk as the first source of micronutrients. In: Michaelsen KF, Neufeld LM, Prentice AM, editors. Global landscape of nutrition challenges in infants and children. 93rd Nestlé Nutrition Institute Workshop, Kolkata, March 2019. Basel, Switzerland: Karger Publishers; 2020. p. 67–76.
5. Allen LH. Maternal micronutrient malnutrition: effects on breast milk and infant nutrition, and priorities for intervention. SCN News 1994;(11):21–4.
6. Kennedy DO. B vitamins and the brain: mechanisms, dose and efficacy—a review. Nutrients 2016;8(2):68.
7. Magnúsdóttir S, Ravcheev D, de Crécy-Lagard V, Thiele I. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes. Front Genet 2015; 6:148.
8. Kirkland JB. Niacin. In: Zempleni J, Suttie JW, Gregory JF III, Stover PJ, editors. Handbook of vitamins. 5th ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2014. p. 149–90.
9. Meyer-Ficca M, Kirkland JB. Niacin. Adv Nutr 2016;7(3):556–8.
10. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington (DC): National Academy Press; 1998.
11. Glier MB, Green TJ, Devlin AM. Methyl nutrients, DNA methylation, and cardiovascular disease. Mol Nutr Food Res 2014;58(1):172–82.
12. Derbyshire E, Obeid R. Choline, neurological development, and brain function: a systematic review focusing on the first 1000 days. Nutrients 2020;12(6):1731.
13. Dror DK, Allen LH. Overview of nutrients in human milk. Adv Nutr 2018;9(suppl_1):278S–94S.
14. Allen LH. B vitamins in breast milk: relative importance of maternal status and intake, and effects on infant status and function. Adv Nutr 2012;3(3):362–9.
15. Allen LH, Hampel D, Shahab-Ferdows S, York ER, Adair LS, Flax VL, Tegha G, Chasela CS, Kamwendo D, Jamieson DJ, et al. Antiretroviral therapy provided to HIV-infected Malawian women in a randomized trial diminishes the positive effects of lipid-based nutrient supplements on breastmilk B vitamins. Am J Clin Nutr 2015;102:1468–74.
16. Allen LH, Hampel D. Water-soluble vitamins in human milk factors affecting their concentration and their physiological significance. Nestle Nutr Inst Workshop Ser 2019;90:69–81.
17. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Banco de Leite Humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Brasilia, Brazil: ANVISA; 2008.
18. Ferreira AL, Alves R, Figueiredo A, Alves-Santos N, Freitas-Costa N, Batalha M, Yonemitsu C, Manivong N, Furst A, Bode L, et al. Human milk oligosaccharide profile variation throughout postpartum in healthy women in a Brazilian cohort. Nutrients 2020;12(3):790.

19. Hampel D, Shahab-Ferdows S, Adair LS, Bentley ME, Flax VL, Jamieson DJ, Ellington SR, Tegha G, Chasela CS, Kamwendo D, et al. Thiamin and riboflavin in human milk: effects of lipid-based nutrient supplementation and stage of lactation on vitamer secretion and contributions to total vitamin content. PLoS One 2016;11:e0149479.
20. Hampel D, York ER, Allen LH. Ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry (UPLC–MS/MS) for the rapid, simultaneous analysis of thiamin, riboflavin, flavin adenine dinucleotide, nicotinamide and pyridoxal in human milk. J Chromatogr B 2012;903:7–13.
21. Hampel D, Shahab-Ferdows S, Domek JM, Siddiqua T, Raqib R, Allen LH. Competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for vitamin B12 analysis in human milk. Food Chem 2014;153:60–5.
22. Hampel D, Shahab-Ferdows S, Nguyen N, Kac G, Allen LH. High throughput analysis of water-soluble forms of choline and related metabolites in human milk by UPLC-MS/MS and its application. Front Nutr 2021;7:604570.
23. Yang S, Hutcheon JA. Identifying outliers and implausible values in growth trajectory data. Ann Epidemiol 2016;26(1):77–80.e2.
24. Barbieri P, Crivellenti L, Nishimura R, Sartorelli D. Validation of a food frequency questionnaire to assess food group intake by pregnant women. J Hum Nutr Diet 2015;28:38–44.
25. Molina MdCB, Benseñor IM, Cardoso LdO, Velasquez-Melendez G, Drehmer M, Pereira TSS, Faria CPd, Melere C, Manato L, Gomes ALC, et al. Reproducibility and relative validity of the food frequency questionnaire used in the ELSA-Brasil. Cad Saude Publica 2013;29(2):379–89.
26. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA)-UNICAMP. Tabela brasileira de composição de alimentos [Brazilian table of food composition]. Campinas, Brazil: NEPA-UNICAMP; 2011 (in Portuguese).
27. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares, 2008–2009. Tabelas de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil. Rio de Janeiro, Brazil: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2011.
28. USDA Agricultural Research Service (ARS). USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28. Beltsville, MD: Nutrient Data Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, ARS, USDA; 2016.
29. Willett WC, Howe GR, Kushi LH. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. Am J Clin Nutr 1997;65(4):1220S–8S.
30. World Health Organization. Indicators for assessing infant and young child feeding practices: part 1: definitions: conclusions of a consensus meeting held 6–8 November 2007 in Washington, DC, USA. Geneva, Switzerland: WHO; 2008.
31. World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO expert committee. World Health Organ Tech Rep Ser 1995;854:215–23.
32. Chatfield M, Mander A. The Skillings–Mack test (Friedman test when there are missing data). Stata J 2009;9(2):299–305.
33. Altman DG, Bland JM. Interaction revisited: the difference between two estimates. BMJ 2003;326(7382):219.
34. Allen LH, Carriquiry AL, Murphy SP. Perspective: proposed harmonized nutrient reference values for populations. Adv Nutr 2020;11(3):469–83.
35. Xue Y, Redeuil KM, Giménez EC, Vinyes-Pares G, Zhao A, He T, Yang X, Zheng Y, Zhang Y, Wang P, et al. Regional, socioeconomic, and dietary factors influencing B

vitamins in human milk of urban Chinese lactating women at different lactation stages. BMC Nutr 2017;3:22.
36. Daly SE, Hartmann PE. Infant demand and milk supply. Part 1: infant demand and milk production in lactating women. J Hum Lact 1995;11(1):21–6.
37. Kent JC, Prime DK, Garbin CP. Principles for maintaining or increasing breast milk production. J Obstet Gynecol Neonatal Nurs 2012;41(1):114–21.
38. Bravi F, Wiens F, Decarli A, Dal Pont A, Agostoni C, Ferraroni M. Impact of maternal nutrition on breastmilk composition: a systematic review. Am J Clin Nutr 2016;104(3):646–62.
39. Gibson RS, Rahmannia S, Diana A, Leong C, Haszard JJ, Hampel D, Reid M, Erhardt J, Suryanto AH, Sofiah WN, et al. Association of maternal diet, micronutrient status, and milk volume with milk micronutrient concentrations in Indonesian mothers at 2 and 5 months postpartum. Am J Clin Nutr 2020;112(4):1039–50.
40. Deegan KL, Jones KM, Zuleta C, Ramirez-Zea M, Lildballe DL, Nexo E, Allen LH. Breast milk vitamin B-12 concentrations in Guatemalan women are correlated with maternal but not infant vitamin B-12 status at 12 months postpartum. J Nutr 2012;142(1):112–16.
41. Neumann CG, Oace SM, Chaparro MP, Herman D, Drorbaugh N, Bwibo NO. Low vitamin B12 intake during pregnancy and lactation and low breast milk vitamin B12 content in rural Kenyan women consuming predominantly maize diets. Food Nutr Bull 2013;34:151–9.
42. Murphy SP, Allen LH. Nutritional importance of animal source foods. J Nutr 2003;133(11):3932S–5S.
43. Watanabe F. Vitamin B12 sources and bioavailability. Exp Biol Med 2007;232(10):1266–74.
44. Williams AM, Chantry CJ, Young SL, Achando BS, Allen LH, Arnold BF, Colford JM Jr, Dentz HN, Hampel D, Kiprotich MC, et al. Vitamin B-12 concentrations in breast milk are low and are not associated with reported household hunger, recent animal-source food, or vitamin B-12 intake in women in rural Kenya. J Nutr 2016;146:1125–31.
45. Patterson K, Bhagwat S, Williams J, Howe J, Holden J, Zeisel S, Dacosta KA, Mar MH. USDA database for the choline content of common foods release 2. Washington (DC): Agricultural Research Service; 2008.
46. Fischer LM, da Costa KA, Galanko J, Sha W, Stephenson B, Vick J, Zeisel SH. Choline intake and genetic polymorphisms influence choline metabolite concentrations in human breast milk and plasma. Am J Clin Nutr 2010;92(2):336–46.
47. Lweno ON, Sudfeld CR, Hertzmark E, Manji KP, Aboud S, Noor RA, Masanja H, Salim N, Shahab-Ferdows S, Allen LH, et al. Vitamin B12 is low in milk of early postpartum women in urban Tanzania, and was not significantly increased by high dose supplementation. Nutrients 2020;12(4):963.
48. Gao X, Wang Y, Randell E, Pedram P, Yi Y, Gulliver W, Sun G. Higher dietary choline and betaine intakes are associated with better body composition in the adult population of Newfoundland, Canada. PLoS One 2016;11(5):e0155403.
49. Lotto V, Choi S-W, Friso S. Vitamin B6: a challenging link between nutrition and inflammation in CVD. Br J Nutr 2011;106(2): 183–95.
50. Ulvik A, Midttun Ø, Pedersen ER, Eussen SJ, Nygård O, Ueland PM. Evidence for increased catabolism of vitamin B-6 during systemic inflammation. Am J Clin Nutr 2014;100(1):250–5.

51. Yanaka N, Kanda M, Toya K, Suehiro H, Kato N. Vitamin B6 regulates mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor-γ target genes. Exp Ther Med 2011;2(3):419–24.
52. Surendran S, Jayashri R, Drysdale L, Bodhini D, Lakshmipriya N, Rani CSS, Sudha V, Lovegrove JA, Anjana RM, Mohan V, et al. Evidence for the association between *FTO* gene variants and vitamin B12 concentrations in an Asian Indian population. Genes Nutr 2019;14(1):26.
53. Wiedeman AM, Barr SI, Green TJ, Xu Z, Innis SM, Kitts DD. Dietary choline intake: current state of knowledge across the life cycle. Nutrients 2018;10(10):1513.

Table 1. Characteristics of women with human milk samples followed in the Brazilian cohort, Rio de Janeiro, Brazil (n=100)[1]

Characteristics	n (%)
Maternal age (years) (n=100)	
18- 19	6 (6.0)
20- 29	62 (62.0)
≥ 30	32 (32.0)
Education (years) (n=99)	
<8	13 (13.1)
8- 12	73 (73.8)
> 12	13 (13.1)
Skin color (n=99)	
White	13 (13.1)
Black	24 (24.2)
Mixed	59 (59.6)
Other	3 (3.1)
Prepregnancy BMI (kg/m²) (n=100)	
Underweight (<18.5)	3 (3.0)
Normal weight (18.5-24.9)	51 (51.0)
Overweight (25.0-29.9)	32 (32.0)
Obesity (≥30.0)	14 (14.0)
Parity (n=100)	
Primiparous	54 (54.0)
Multiparous	46 (46.0)

Use of supplements containing B vitamin or choline during pregnancy (n=100)	
Yes	20 (20.0)
No	80 (80.0)
Smoking during pregnancy (n=99)	
Yes	2 (2.0)
No	97 (98.0)
Alcohol intake during pregnancy (n=99)	
Yes	45 (45.5)
No	54 (54.5)
Mode of delivery (n=91)	
Cesarean section	34 (37.4)
Vaginal	57 (62.6)
Gestational age at birth (weeks) (n=99)	
36	2 (2.0)
37-39	48 (48.5)
40-42	49 (49.5)
Breastfeeding status[2]	
Exclusive at TP1 (n=52)	48 (92.3)
Exclusive or predominant at TP2 (n=76)	58 (76.3)
Exclusive or predominant at TP3 (n=42)	27 (64.3)

Note:
[1]*n* = 100. TP1 = TP visit 1 (2–8 postpartum days), TP2 = TP visit 2 (28–50 postpartum days), and TP3 = TP visit 3 (88–119 postpartum days). TP, time point.
[2]Exclusive breastfeeding is defined as no other food or drink except breast milk. Predominant breastfeeding is defined as the infant's predominant source of feeding has been breast milk. Still, they may also have received liquids (water, fruit juice) or ritual fluids, drops, or syrups (vitamins, minerals, and medicines) (30).

Table 2. Maternal dietary intake and prevalence of inadequacy during pregnancy and lactation.[1]

Dietary intake[2]	Pregnancy (n=91)			Lactation (n=63)		
	Median (IQR)[3]	H-AR[4]- Prevalence of inadequacy n (%)	RDA/AI[5]- Prevalence of micronutrients below the recommendation n (%)	Median (IQR)[3]	H-AR[4]- Prevalence of inadequacy n (%)	RDA/AI[5]- Prevalence of micronutrients below the recommendation n (%)
Thiamin, mg/day	1.7 (1.2; 2.4)*	23 (25.0)	32 (35.2) [6]	2.4 (1.7; 3.4)*	4 (6.5)	9 (14.3) [6]
Riboflavin, mg/day	2.1 (1.4; 2.8)	24 (26.1)	20 (22.0) [6]	2.1 (1.4; 3.1)	22 (35.5)	21 (33.3)[6]
Niacin, mg/day	26.7 (20.5; 35.6)*	9 (9.8)	19 (20.9) [6]	33.2 (23.9; 48.8)*	2 (3.2)	6 (9.5) [6]
Pantothenic acid, mg/day	6.4 (5.2; 8.9)*	7 (7.6)	41 (45.1) [7]	7.7 (5.5; 10.3)*	16 (25.8)	27 (42.8) [7]
B-6, mg/day	2.2 (1.6; 3.1)*	17 (18.5)	33 (36.3) [6]	2.7 (2.0; 3.9)*	2 (3.2)	15 (23.8) [6]
B-12, µg/day	5.5 (3.9; 6.8)	4 (4.4)	6 (6.6) [6]	6.3 (3.9; 8.4)	4 (6.5)	5 (7.9) [6]
Choline, mg/day	381.0 (281.8; 499.3)*	48 (52.2)	59 (64.8) [7]	549.5 (392.4; 813.8)*	17 (27.0)	32 (50.8) [7]
Energy intake, kcal/day	2689.6 (2006.9; 3586.3)	-	-	2716.3(2052.1; 3989.5)	-	-
Red meat intake, g/day	31.6 (18.4; 50.0)	-	-	40.0 (12.8; 80.0)	-	-
Chicken, g/day	71.0 (43.4; 130.2)	-	-	88.0 (32.0; 148.0)	-	-
Fish, g/day	7.6 (0.5; 18.5)*	-	-	16.8 (0.0; 38.0)*	-	-
Eggs, g/day	13.2 (1.6; 37.9)*	-	-	23.2 (7.0; 53.2)*	-	-
Cow milk, ml/day	230.1 (78.9; 460.3)	-		120.0 (96.0; 300.0)	-	-

[1]AI, Adequate Intake; H-AR, Harmonized Average Requirement.
[2]Adjusted for total daily energy intake using the residual nutrient method (29).
[3]Wilcoxon matched-pairs signed-rank test was performed to compare medians between pregnancy and lactation. $*P < 0.05$.
[4]According to Allen et al. (34).
[5]According to the Institute of Medicine (10).
[6]RDA.
[7]AI.

Table 3. B-vitamin and choline concentrations in milk at each postpartum visit.[1]

Vitamins	**2-8 d (n=52)[2]**	**28-50 d (n=76)[3]**	**88-119 d (n=42)[4]**	*P*[5]
Thiamin (µg/L)	24 (15; 33)[a, b]	109 (84; 129)[a,c]	99 (71; 122)[b,c]	<0.001
Riboflavin (µg/L)	89 (62; 160)	113 (78; 182)	120 (62; 201)	0.988
Niacin (µg/L)	544 (365; 865)[a]	1140 (833; 1585)[a, c]	513 (402; 994)[c]	<0.001
Pantothenic acid (µg/L)	999 (708; 1434)[a]	1467 (1121; 1972)[a]	1351 (1095; 1740)	<0.001
B-6 (µg/L)	13 (5; 38)[a, b]	95 (65; 139)[a,c]	134 (101; 200)[b, c]	<0.001
B-12 (pmol/L)	270 (195; 406)	238 (182; 332)	250 (159; 325)	0.240
Choline (mg/L)[6]	125 (95; 150)	136 (123; 162)	132 (100; 144)	0.155

[1]Values are medians [IQRs] unless otherwise indicated.
[2]Thiamin: *n* = 49; riboflavin: *n* = 49; niacin: *n* = 51; vitamin B-6: *n* = 37; vitamin B-12: *n* = 50; choline: *n* = 51.
[3]Thiamin: *n* = 72; choline: *n* = 75.
[4]Thiamin: *n* = 41.
[5]Skillings–Mack test.
Medians that share a common superscript letter were significantly different at $P < 0.05$ based on the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test that was used to compare concentrations by each pair of visits: [a] medians between 2–8 d and 28–50 d were significantly different, [b] medians between 2–8 d and 88–119 d were significantly different, [c] medians between 28–50 d and 88–119 d were significantly different.
[6]The median [IQR] concentrations choline in milk converted to µmol/L were 1220 [912–1440] µmol/L, 1305 [1181–1555] µmol/L, and 1267 [960–1382] µmol/L at 2–8, 28–50, and 88–119 postpartum days, respectively. Total water-soluble choline is the sum of free choline, phosphocholine, and glycerophosphocholine.

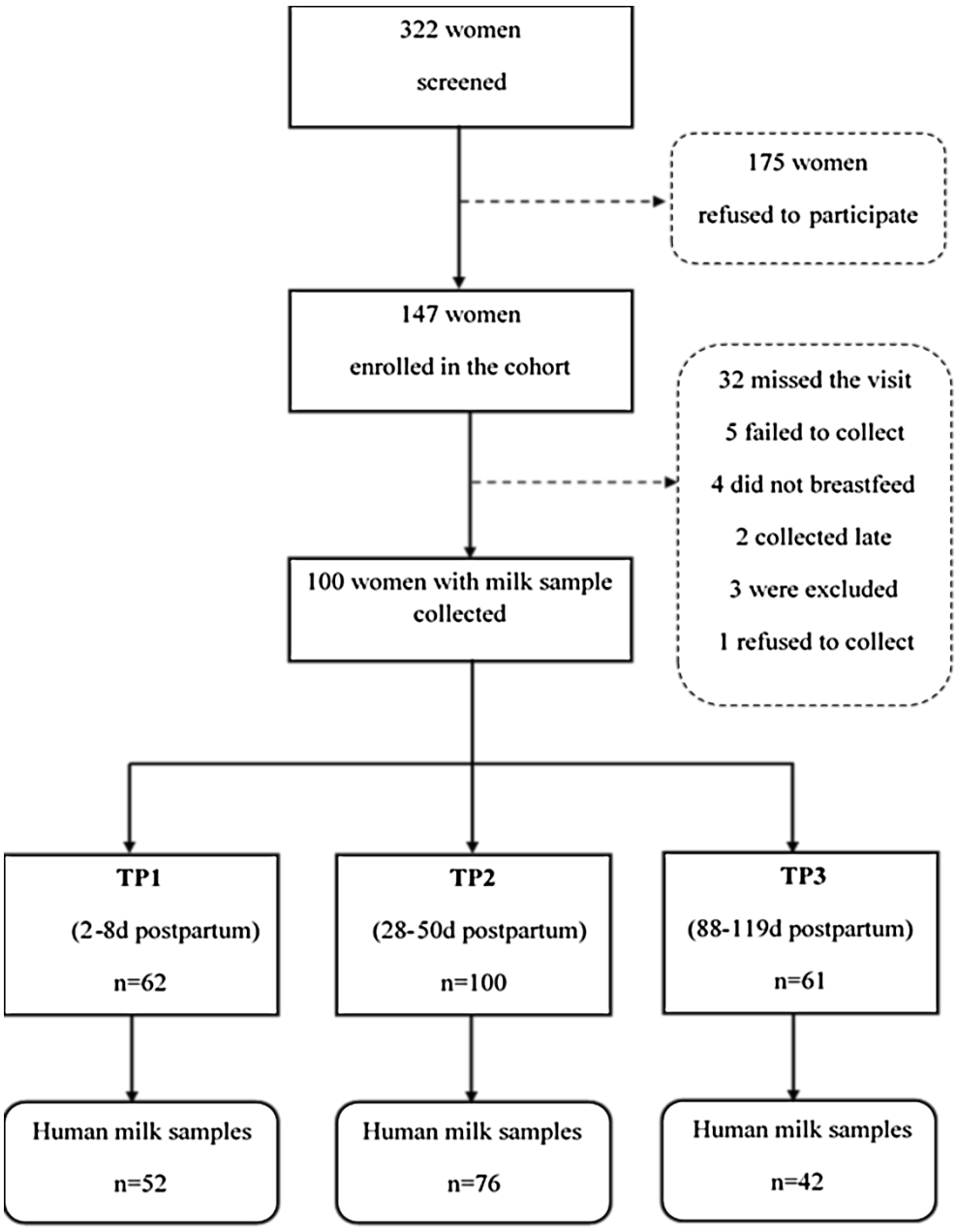


FIGURE 1. Flow diagram of the final samples for the analysis of B vitamins and choline in milk during lactation of women followed on Brazilian cohort, Rio de Janeiro, Brazil.

Notes: The 32 subjects who missed the visit refer to the eligible women followed at the cohort baseline but did not attend TP1, TP2, and TP3. The 3 subjects were excluded according to the exclusion criteria.

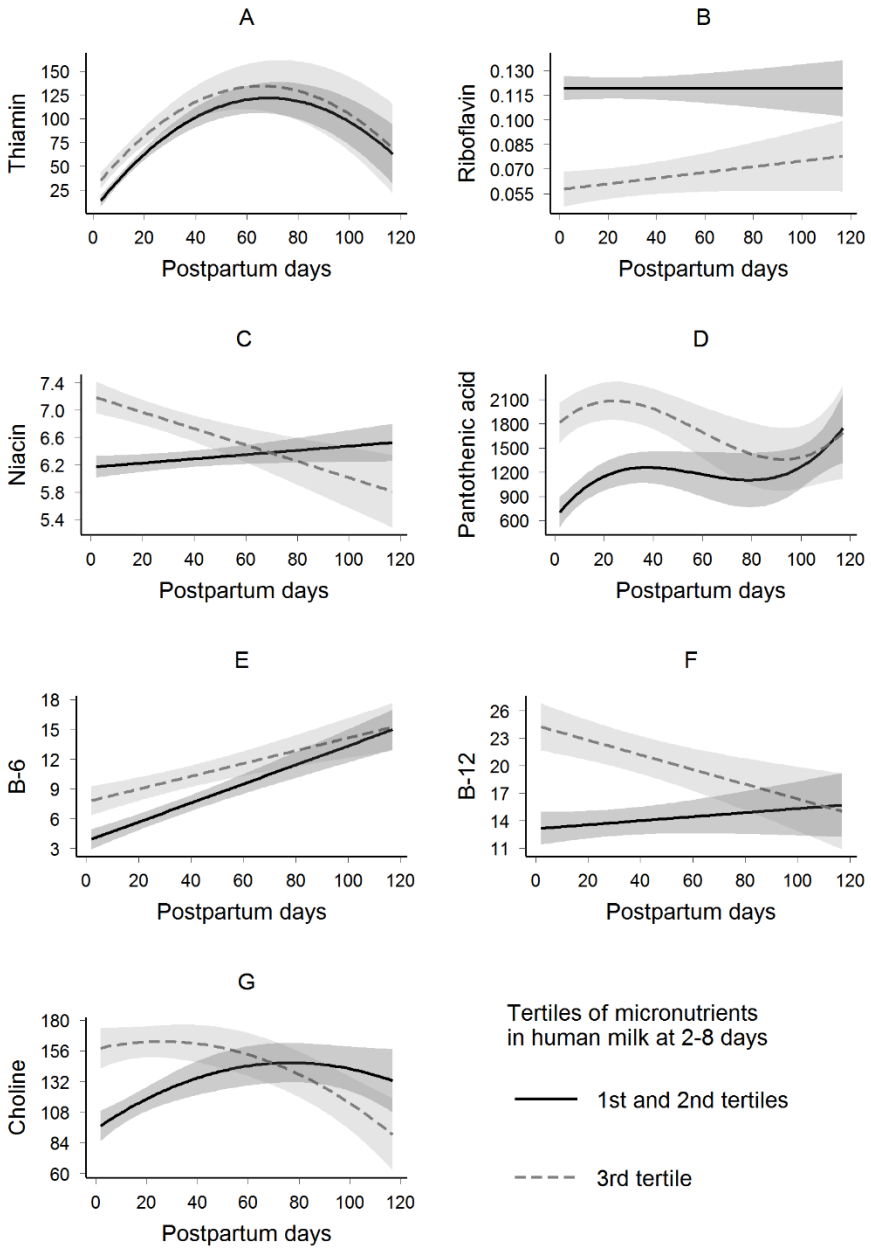


FIGURE 2. Longitudinal predictions of B-vitamin and choline milk concentrations according to these micronutrients' concentration at 2-8 days.

Notes: Longitudinal linear mixed-effect models for B-vitamin and choline in human milk concentrations were performed. Beta coefficients interactions ($\beta_{interaction}$) and standard error (SE) were estimated. These parameters were used to evaluate changes in the third tertile of a specific micronutrient milk concentration at 2-8 days on the trajectory of that micronutrient compared to the 1st and 2nd tertiles. **A**: $\beta_{interaction}$ = -0.14

(0.25); p-value=0.58. Thiamin (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. **B:** $\beta_{interaction}$ = 0.00 (0.00); p-value=0.21. Riboflavin (µg/L) was inverse square-root transformed. **C:** $\beta_{interaction}$ = -0.02 (0.00); p-value<0.001. Niacin (µg/L) was log transformed. **D:** $\beta_{interaction}$ = -0.10 (2.56); p-value<0.001. Pantothenic acid (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear, quadratic and cubic postpartum days. **E:** $\beta_{interaction}$ = -0.03 (0.02); p-value=0.07. Vitamin B-6 (µg/L) was square-root transformed. **F:** $\beta_{interaction}$ = -0.10 (0.03); p-value<0.001. Vitamin B-12 (pmol/L) was square-root transformed. **G:** $\beta_{interaction}$ = -0.90 (0.18); p-value<0.001. Total water-soluble form of choline (mg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. Total water-soluble form of choline is the sum of free choline, phosphocholine, glycerophosphocholine. Number of observations for the 1st and 2nd tertiles: thiamin, n=32; riboflavin, n=32; niacin, n=34; pantothenic acid, n=35; B-6, n=24; B-12, n=34; choline, n=34. Number of observations for the 3rd tertile: thiamin, n=17; riboflavin, n=17; niacin, n=17; pantothenic acid, n=17; B-6, n=13; B-12, n=16; choline, n=17.

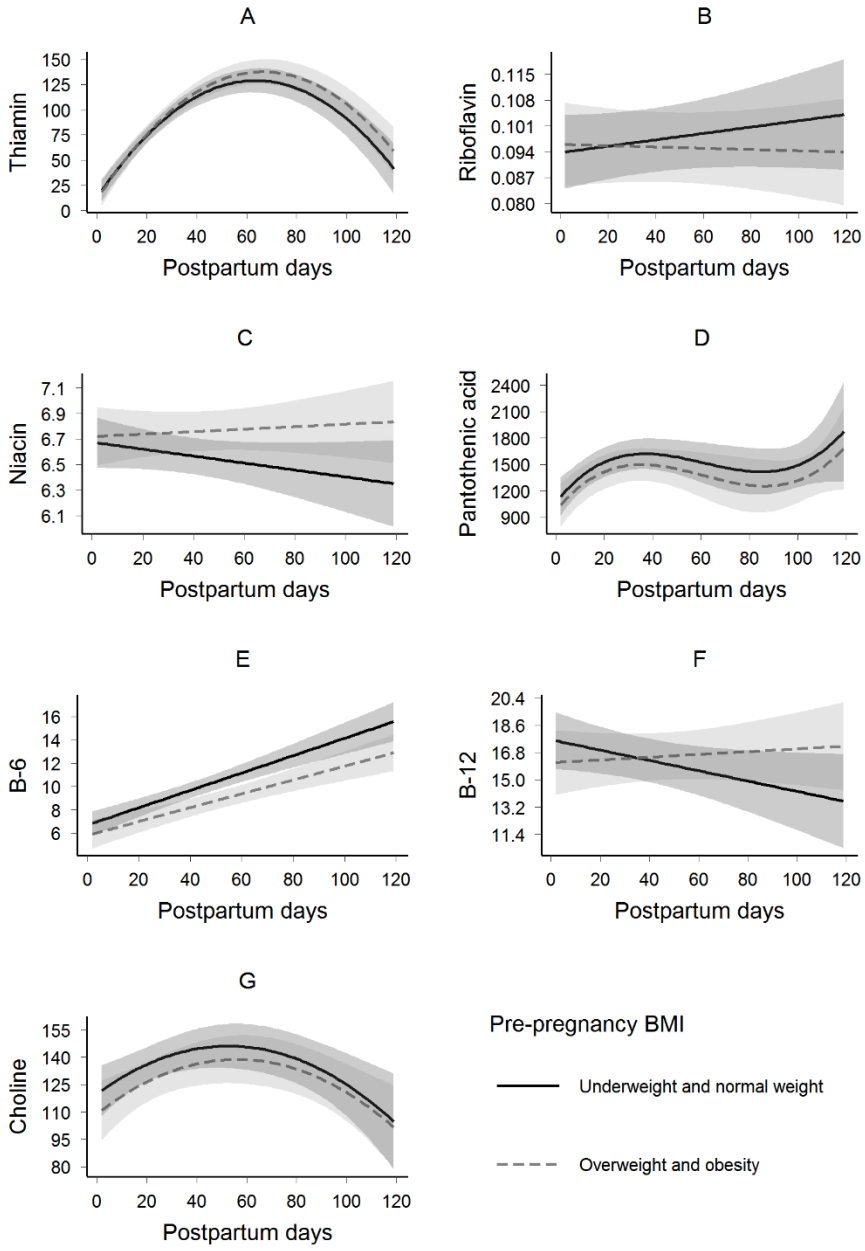


FIGURE 3. Longitudinal predictions of B-vitamin and choline milk concentrations according to prepregnancy BMI.

Notes: Longitudinal linear mixed-effect models for B-vitamin and choline in human milk concentrations were performed. The models were adjusted for parity. Beta coefficients interactions ($\beta_{interaction}$) and standard error (SE) were estimated. These parameters were used to evaluate the changes of having prepregnancy overweight and obesity on the trajectory of each human milk micronutrient compared to being underweight or normal weight. **A:** $\beta_{interaction}$ = 0.16 (0.15); p-value=0.30. Thiamin (µg/L) was not transformed, but the

model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. **B:** $\beta_{interaction}$ = -0.00 (0.00); p-value=0.32. Riboflavin (µg/L) was inverse square-root transformed. **C:** $\beta_{interaction}$ = 0.00 (0.00); p-value=0.16. Niacin (µg/L) was log transformed. **D:** $\beta_{interaction}$ = -0.82 (2.25); p-value=0.71. Pantothenic acid (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear, quadratic and cubic postpartum days. **E:** $\beta_{interaction}$ = -0.02 (0.01); p-value=0.33. Vitamin B-6 (µg/L) was square-root transformed. **F:** $\beta_{interaction}$ = 0.04 (0.02); p-value=0.06. Vitamin B-12 (pmol/L) was square-root transformed. **G:** $\beta_{interaction}$ = 0.07 (0.17); p-value=0.74. Total water-soluble form of choline (mg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. Total water-soluble form of choline is the sum of free choline, phosphocholine, glycerophosphocholine. Number of participants with prepregnancy overweight: **A:** n=44; **B:** n=46; **C:** n=46; **D:** n=46; **E:** n=43; **F:** n=46; **G:** n=45. Number of participants with prepregnancy underweight or normal weight: **A:** n=53; **B:** n=54; **C:** n=52; **D:** n=54; **E:** n=52; **F:** n=54; **G:** n=54.

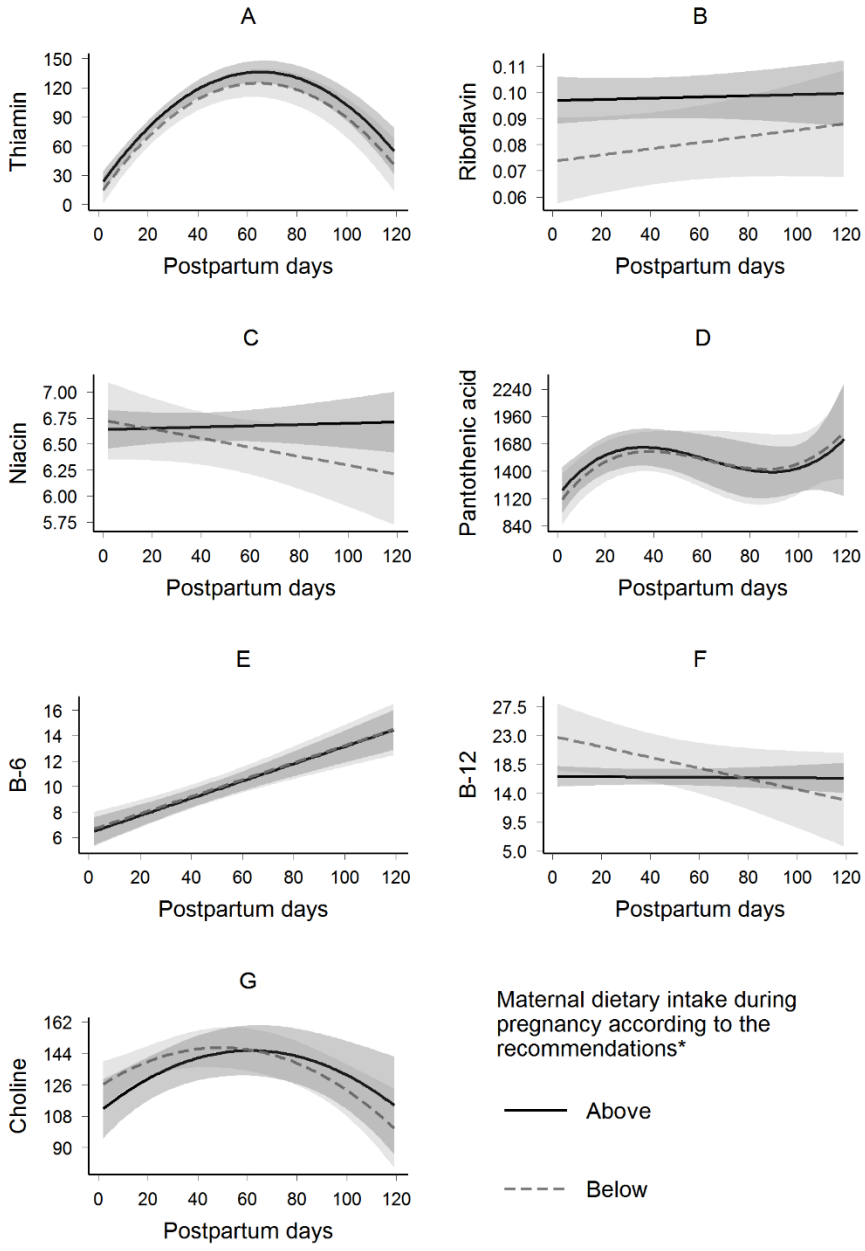


FIGURE 4. Longitudinal predictions of B-vitamin and choline milk concentrations according to each micronutrient's recommendations during pregnancy.

Notes: Longitudinal linear mixed-effect models for B-vitamin and choline in human milk concentrations were performed and adjusted for maternal prepregnancy BMI and the use of B-vitamin and choline supplements during pregnancy. Beta coefficients interactions ($\beta_{interaction}$) and standard error (SE) were estimated. These parameters were used to evaluate the changes in the intake of specific micronutrients below the recommendations on the trajectory of that human milk micronutrient compared with the intake above

the recommendations during pregnancy. * Recommended Daily Allowance (RDA) for thiamin, riboflavin, niacin, B-6, B-12, and the Adequate Intake (AI) for pantothenic acid and choline, according to the IOM (10). **A:** $\beta_{interaction}$ = -0.05 (0.16); p-value=0.80. Thiamin (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. **B:** $\beta_{interaction}$ = 0.00 (0.00); p-value=0.43. Riboflavin (µg/L) was inverse square-root transformed. **C:** $\beta_{interaction}$ = -0.01 (0.00); p-value=0.19. Niacin (µg/L) was log-transformed. **D:** $\beta_{interaction}$ = 1.42 (2.40); p-value=0.57. Pantothenic acid (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear, quadratic, and cubic postpartum days. **E:** $\beta_{interaction}$ = -0.00 (0.02); p-value=0.91. Vitamin B-6 (µg/L) was square-root transformed. **F:** $\beta_{interaction}$ = -0.08 (0.05); p-value=0.07. Vitamin B-12 (pmol/L) was square-root transformed. **G:** $\beta_{interaction}$ = -0.23 (0.17); p-value=0.17. The total water-soluble form of choline (mg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. The total water-soluble form of choline is the sum of free choline, phosphocholine, glycerophosphocholine. Number of participants with intake below the RDA: **A:** n=31; **B:** n=20; **C:** n=18; **D:** n=41; **E:** n=32; **F:** n=6; **G:** n=58. Number of observations for participants with intake above the RDA: **A:** n=57; **B:** n=71; **C:** n=71; **D:** n=50; **E:** n=54; **F:** n=85; **G:** n=32.

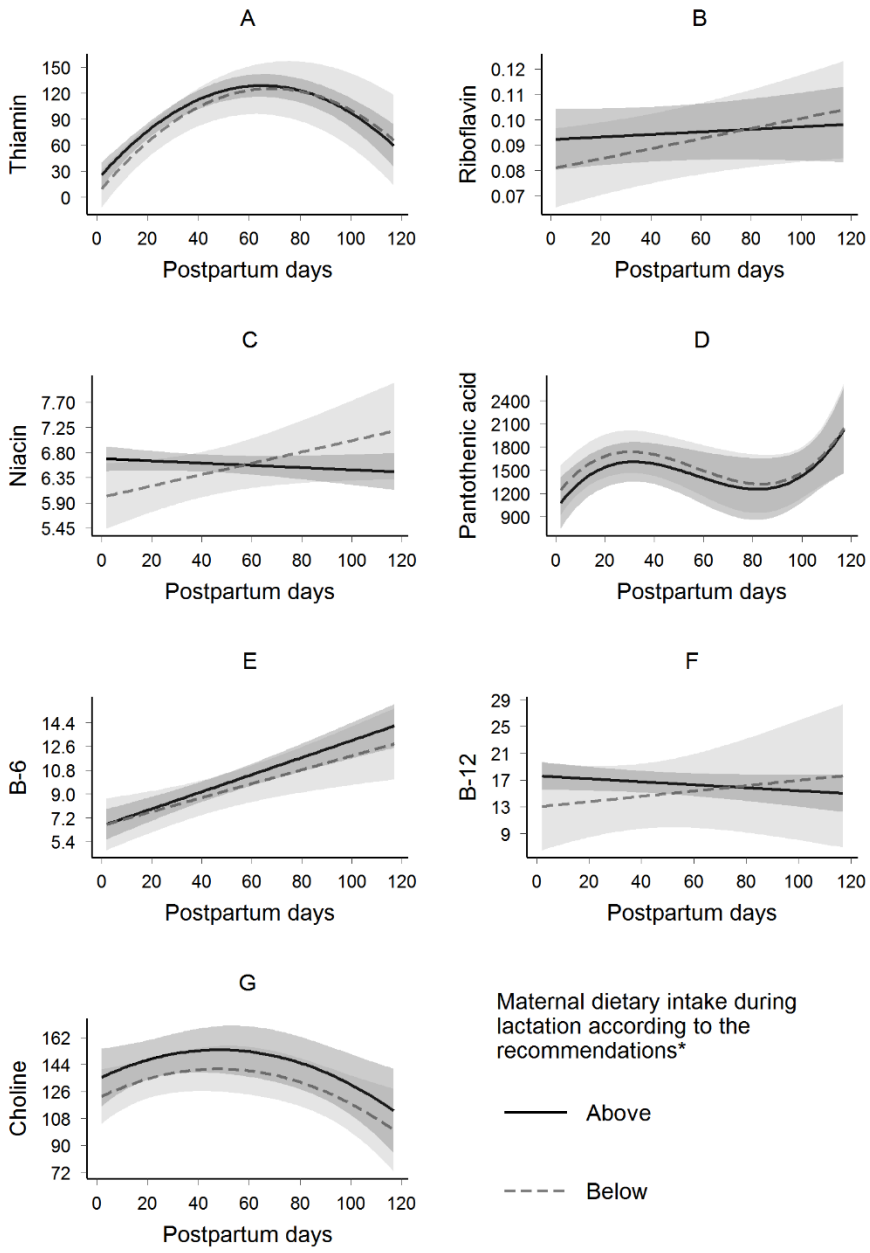


FIGURE 5. Longitudinal predictions of B-vitamin and choline milk concentrations according to each micronutrient's recommendations during lactation.

Notes: Longitudinal linear mixed-effect models for B-vitamin and choline in human milk concentrations were performed and adjusted for maternal prepregnancy BMI, use of B-vitamin, and choline supplement during pregnancy and maternal intake during pregnancy. Beta coefficients interactions ($\beta_{interaction}$) and standard error (SE) were estimated. These parameters were used to evaluate the changes of the intake of specific micronutrients below the recommendations on the trajectory of that human milk micronutrient

compared with the intake above the recommendations during lactation. * Recommended Daily Allowance (RDA) for thiamin, riboflavin, niacin, B-6, B-12, and the Adequate Intake (AI) for pantothenic acid and choline, according to the IOM (10). **A:** $\beta_{interaction}$ = 0.20 (0.27); p-value=0.43. Thiamin (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. **B:** $\beta_{interaction}$ = 0.00 (0.00); p-value=0.20. Riboflavin (µg/L) was inverse square-root transformed. **C:** $\beta_{interaction}$ = 0.01 (0.01); p-value=0.03. Niacin (µg/L) was log-transformed. **D:** $\beta_{interaction}$ = -1.23 (2.65); p-value=0.60. Pantothenic acid (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear, quadratic, and cubic postpartum days. **E:** $\beta_{interaction}$ = -0.01 (0.02); p-value=0.36. Vitamin B-6 (µg/L) was square-root transformed. **F:** $\beta_{interaction}$ = 0.06 (0.06); p-value=0.43. Vitamin B-12 (pmol/L) was square-root transformed. **G:** $\beta_{interaction}$ = -0.00 (0.20); p-value=0.77. The total water-soluble form of choline (mg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. The total water-soluble form of choline is the sum of free choline, phosphocholine, glycerophosphocholine. Number of participants with intake below the RDA: **A:** n=9; **B:** n=21; **C:** n=6; **D:** n=27; **E:** n=15; **F:** n=5; **G:** n=31. Number of observations for participants with intake above the RDA: **A:** n=47; **B:** n=36; **C:** n=50; **D:** n=30; **E:** n=42; **F:** n=52; **G:** n=25.

Supplemental Table 1. Baseline characteristics of women followed in the Brazilian cohort, Rio de Janeiro, Brazil.

	Women with samples (n=100)		**Women without samples (n=47)**		
	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	p[1]
Maternal age (years)	100	25.5 (22.0-31.0)	47	27.0 (23.0-30.0)	0.95
Prepregnancy BMI (kg/m²)	100	24.4 (21.1-28.3)	42	23.6 (21.9- 28.2)	0.88
	n	%	n	%	p[2]
Maternal age (years)					0.88
18-19	6	6.0	4	8.5	
20-29	62	62.0	29	61.7	
≥ 30	32	32.0	14	29.8	
Education (years)					0.39
≤ 12	86	86.9	43	93.5	
> 12	13	13.1	3	6.5	
Skin color					0.06
White	13	13.1	7	15.6	
Black	24	24.2	3	6.7	
Mixed	59	59.6	32	71.7	
Other	3	3.0	3	6.7	
Prepregnancy BMI (kg/m²)					0.42
Underweight (<18.5)	3	3.0	3	7.1	
Normal weight (18.5-24.9)	51	51.0	22	52.4	
Overweight (25.0-29.9)	32	32.0	9	21.4	
Obesity (≥30.0)	14	14.0	8	19.1	

Parity					0.57
Primiparous	54	54.0	23	48.9	
Multiparous	46	46.0	24	51.1	
Mode of delivery					0.97
Cesarean section	34	37.4	7	36.8	
Vaginal	57	62.6	12	63.4	

[1]Mann-Whitney's test

[2] Chi-square or Fisher's exact test

Supplemental Table 2. Models of longitudinal prediction of milk B-vitamin and choline trajectories based on their concentrations at 2-8 postpartum days.

B-vitamin and choline concentrations at 2-8 postpartum days	**Thiamin[1]**	**Riboflavin[2]**	**Niacin[3]**	**Pantothenic acid[4]**	**B-6[5]**	**B-12[6]**	**Choline[7]**
	***β* (SE)[8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**
Main effects							
3rd tertile vs. 1st and 2nd tertile	21.82 (5.11) *	-0.06 (0.01)	1.04 (0.15)*	0.00 (0.02) *	3.95 (0.91) *	11.28 (1.61)*	62.67 (9.20) *
Postpartum days	3.45 (0.23)*	0.00 (0.00)*	0.00 (0.00) ***	0.40 (9.90) *	0.10 (0.01) *	0.02 (0.02)	1.35 (0.37) *
Interaction term Postpartum days # 3rd tertile vs. 1st and 2nd tertile	-0.14 (0.25)	0.00 (0.00)	-0.02 (0.00) *	-0.10(2.56) *	-0.03 (0.02)	-0.10 (0.03) *	-0.90 (0.18) *

Notes: [1]Thiamin (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. [2]Riboflavin (µg/L) was inverse square root transformed. [3]Niacin (µg/L) was log transformed.[4] Pantothenic acid (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear, quadratic, and cubic postpartum days. [5]B-6 vitamin (µg/L) was square root transformed. [6]B-12 vitamin (pmol/L) was square root transformed. [7]The total water-soluble form of choline (mg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. The total water-soluble form of choline is the sum of free choline, phosphocholine, glycerophosphocholine. [8]Longitudinal mixed effect model with beta coefficients (β) and standard error (SE), p-value refers to maximum likelihood estimator. *p-value<0.001, **p-value<0.01, ***p-value<0.05, ****p-value<0.10 (for interactions only).

Supplemental Table 3. Models of longitudinal prediction of milk B-vitamin and choline trajectories based on maternal prepregnancy BMI.

Prepregnancy BMI (kg/m^2)[¥]	**Thiamin**[1]	**Riboflavin**[2]	**Niacin**[3]	**Pantothenic acid**[4]	**B-6**[5]	**B-12**[6]	**Choline**[7]
Main effects	***β* (SE)** [8]	***β* (SE)** [8]	***β* (SE)** [8]	***β* (SE)** [8]	***β* (SE)** [8]	***β* (SE)** [8]	***β* (SE)** [8]
Overweight[9] vs. underweight and normal weight	-1.96 (7.43)	0.00 (0.01)	0.04 (0.16)	-0.94 (0.01)	-0.89 (0.83)	-1.51 (1.46)	-10.90 (9.42)
Postpartum days	3.65 (0.26)*	0.00 (0.01)	-0.00 (0.00)	0.35 (8.93)*	0.07 (0.01)*	-0.03 (0.02)***	1.00 (0.33)*
Interaction term							
Postpartum days # Overweight vs. underweight and normal weight	0.16 (0.15)	-0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	-0.82 (2.25)	-0.02 (0.01)	0.04 (0.02)****	0.07 (0.17)

Note: [¥]The model was adjusted for parity. [1]Thiamin (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. [2]Riboflavin (µg/L) was inverse square root transformed. [3]Niacin (µg/L) was log transformed.[4] Pantothenic acid (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear, quadratic, and cubic postpartum days. [5]B-6 vitamin (µg/L) was square root transformed. [6]B-12 vitamin (pmol/L) was square root transformed. [7]The total water-soluble form of choline (mg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. The total water-soluble form of choline is the sum of free choline, phosphocholine, glycerophosphocholine. [8]Longitudinal mixed-effect model with beta coefficients (β) and standard error (SE), p-value refers to maximum likelihood estimator. *p-value<0.001, **p-value<0.01, ***p-value<0.05, ****p-value<0.10 (for interactions only). [9]Overweight included participants with prepregnancy BMI ≥25kg/m² (participants with overweight and obesity).

Supplemental Table 4. Models of longitudinal prediction of milk B-vitamin and choline trajectories based on maternal intake during pregnancy.

Maternal B- vitamins and choline intake during pregnancy[¥]	**Thiamin[1]**	**Riboflavin[2]**	**Niacin[3]**	**Pantothenic acid[4]**	**B-6[5]**	**B-12[6]**	**Choline[7]**
Main effects	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**
Below vs. above recommendations[9]	-8.55 (7.64)	-0.02 (0.01)**	0.09 (0.21)	-0.96 (0.02)	0.18 (0.89)	6.29 (2.82)**	14.65 (9.39)
Postpartum days	3.68 (0.26)*	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.32 (9.71)*	0.07 (0.01)*	-0.00 (0.01)	1.16 (0.33)*
Interaction term							
Postpartum days # Below vs. above recommendations	-0.05 (0.16)	0.00 (0.00)	-0.01 (0.00)	1.42 (2.40)	-0.00 (0.02)	-0.08 (0.05)****	-0.23 (0.17)

Note: [¥]The model was adjusted for maternal prepregnancy BMI and the use of B-vitamin and choline supplements during pregnancy. [1]Thiamin (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. [2]Riboflavin (µg/L) was inverse square root transformed. [3]Niacin (µg/L) was log transformed.[4] Pantothenic acid (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear, quadratic, and cubic postpartum days. [5]B-6 vitamin (µg/L) was square root transformed. [6]B-12 vitamin (pmol/L) was square root transformed. [7]The total water-soluble form of choline (mg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. The total water-soluble form of choline is the sum of free choline, phosphocholine, glycerophosphocholine. [8]Longitudinal mixed-effect model with beta coefficients (β) and standard error (SE), p-value refers to maximum likelihood estimator. *p-value<0.001, **p-value<0.01, ***p-value<0.05, ****p-value<0.10 (for interactions only). [9]Recommended Daily Allowance (RDA) for thiamin, riboflavin, niacin, B-6, B-12, and the Adequate Intake (AI) for pantothenic acid and choline, according to the *Institute of Medicine* (IOM, 1998).

Supplemental Table 5. Models of longitudinal prediction of milk B-vitamin and choline trajectories based on maternal intake during lactation.

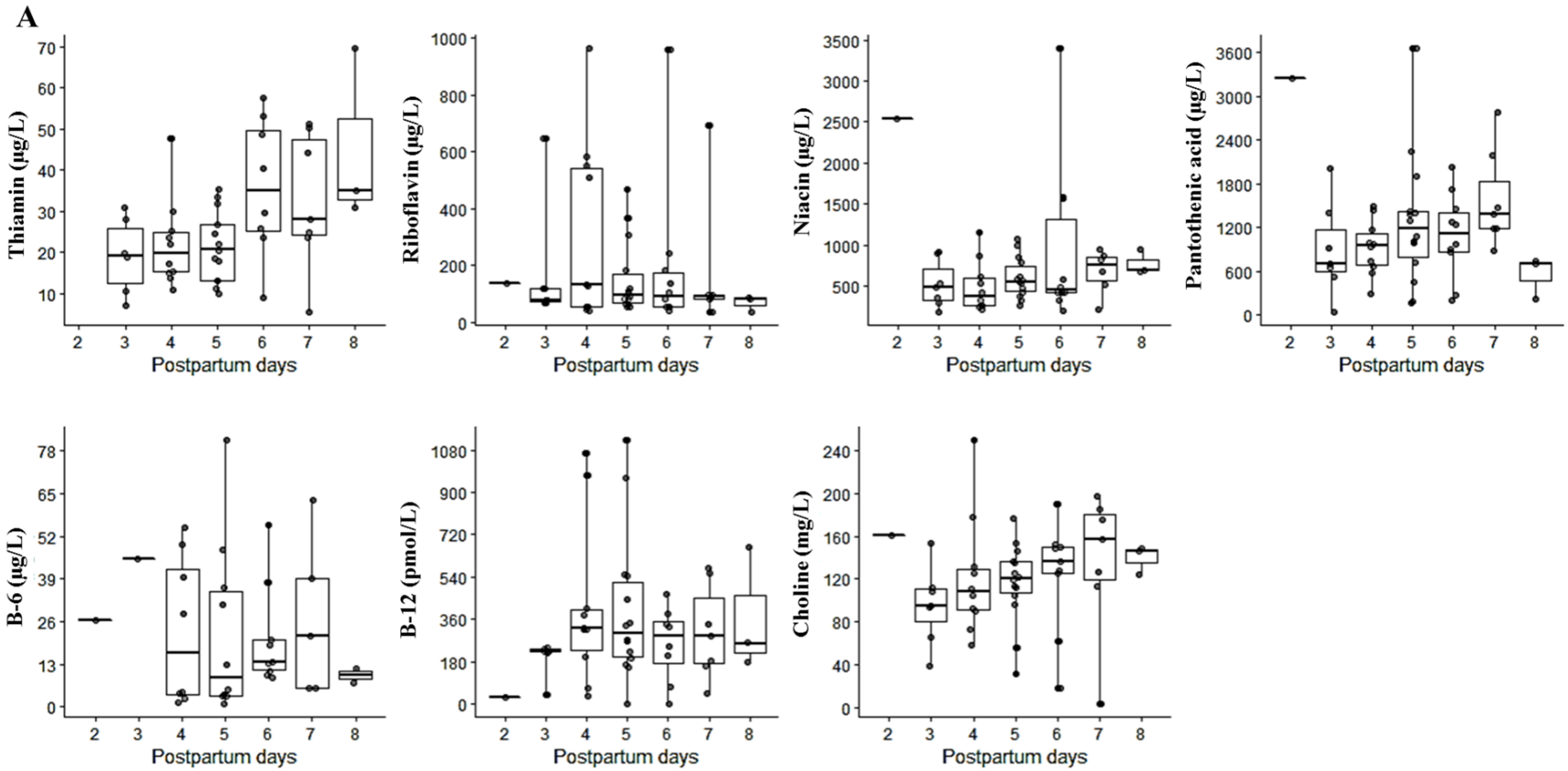
Maternal B- vitamins and choline intake during lactation[¥]	**Thiamin[1]**	**Riboflavin[2]**	**Niacin[3]**	**Pantothenic acid[4]**	**B-6[5]**	**B-12[6]**	**Choline[7]**
Main effects	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**
Below vs. above recommendations[9]	-16.47 (12.25)	-0.01 (0.01)	-0.69 (0.32)**	0.02 (0.02)	0.02 (1.16)	-4.66 (3.53)	-12.71(11.56)
Postpartum days	3.36 (0.35)	0.00 (0.00)	-0.00 (0.00)	0.44 (0.11)*	0.06 (0.01)*	-0.02 (0.02)	0.83 (0.43)
Interaction term							
Postpartum days # Below vs. above recommendations	0.20 (0.27)	0.00 (0.00)	0.01 (0.01)***	-1.23 (2.65)	-0.01(0.02)	0.06 (0.06)	-0.00 (0.20)

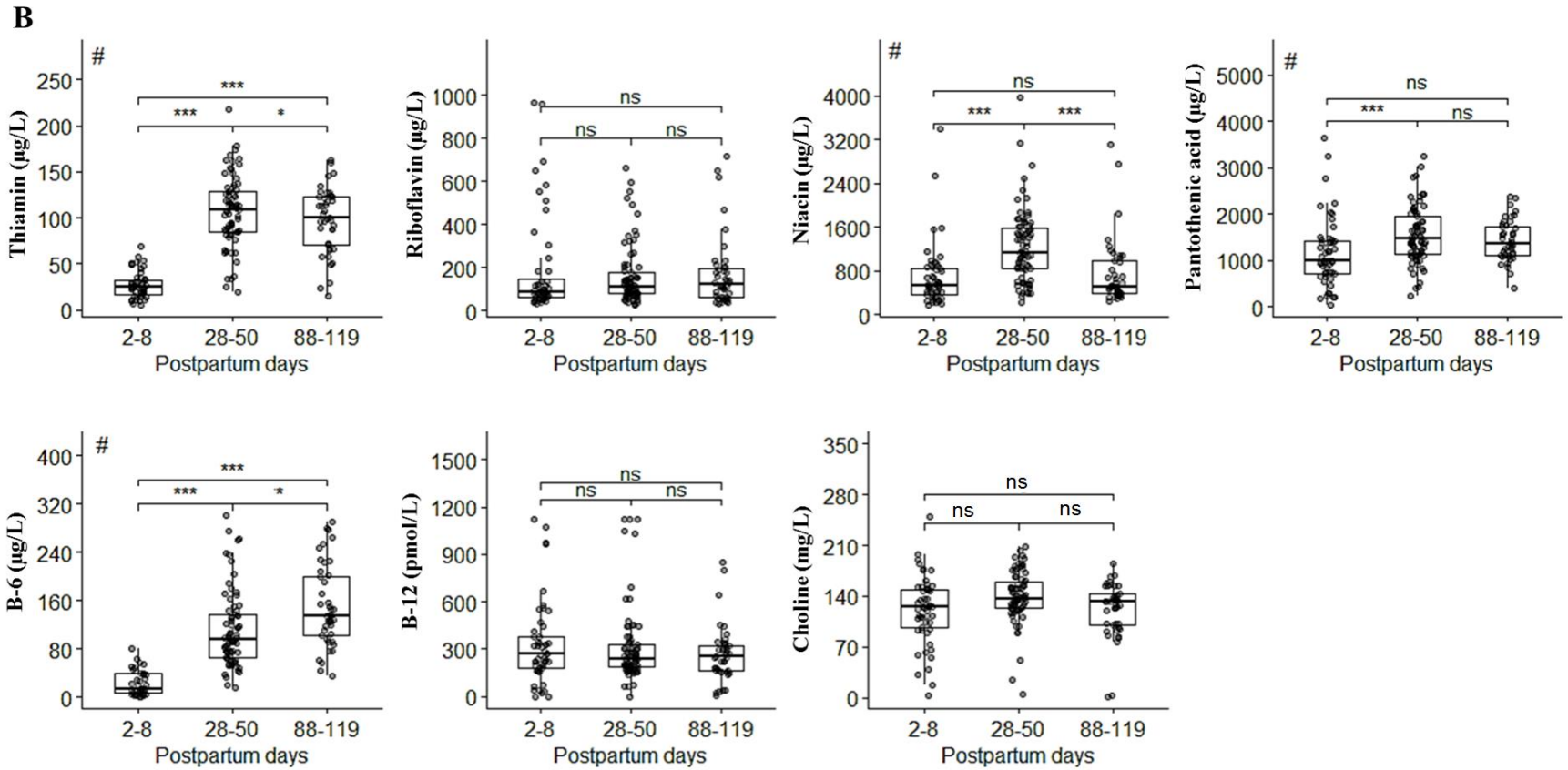
Note: [¥]The model was adjusted for maternal prepregnancy BMI, use of B-vitamin, and choline supplement during pregnancy and maternal intake during pregnancy. [1]Thiamin (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. [2]Riboflavin (µg/L) was inverse square root transformed. [3]Niacin (µg/L) was log transformed.[4] Pantothenic acid (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear, quadratic, and cubic postpartum days. [5]B-6 vitamin (µg/L) was square root transformed. [6]B-12 vitamin (pmol/L) was square root transformed. [7]The total water-soluble form of choline (mg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. The total water-soluble form of choline is the sum of free choline, phosphocholine, glycerophosphocholine. [8]Longitudinal mixed-effect model with beta coefficients (β) and standard error (SE), p-value refers to maximum likelihood estimator. *p-value<0.001, **p-value<0.01, ***p-value<0.05, ****p-value<0.10 (for interactions only). [9]Recommended Daily Allowance (RDA) for thiamin, riboflavin, niacin, B-6, B-12, and the Adequate Intake (AI) for pantothenic acid and choline, according to the *Institute of Medicine* (IOM, 1998).

Supplemental Table 6. Models of longitudinal prediction of milk B-vitamin and choline trajectories based on gestational age at birth.

Gestational age (weeks)[¥]	**Thiamin[1]**	**Riboflavin[2]**	**Niacin[3]**	**Pantothenic acid[4]**	**B-6[5]**	**B-12[6]**	**Choline[7]**
Main effects	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**	***β* (SE) [8]**
40-42 vs.37-39	-4.35 (7.30)	-0.00 (0.01)	-0.26 (0.15)*	-0.75(0.02)	-0.16 (0.83)	0.65 (1.46)	-23.25 (9.27)**
Postpartum days	3.77 (0.27)*	0.00 (0.00)	-0.00 (0.00)	0.37 (9.33)*	0.07 (0.01)*	-0.01 (0.02)	0.66 (0.34)
Interaction term							
Postpartum days # 40-42 vs.37-39 weeks	-0.03 (0.16)	0.00 (0.00)	-0.00(0.00)	-1.88 (2.31)	-0.00 (0.01)	0.01 (0.03)	0.54 (0.16)**

Note: [¥]The model was adjusted for maternal prepregnancy BMI and parity. [1]Thiamin (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. [2]Riboflavin (µg/L) was inverse square root transformed. [3]Niacin (µg/L) was log transformed.[4] Pantothenic acid (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear, quadratic, and cubic postpartum days. [5]B-6 vitamin (µg/L) was square root transformed. [6]B-12 vitamin (pmol/L) was square root transformed. [7]The total water-soluble form of choline (mg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. The total water-soluble form of choline is the sum of free choline, phosphocholine, glycerophosphocholine. [8]Longitudinal mixed-effect model with beta coefficients (β) and standard error (SE), p-value refers to maximum likelihood estimator. *p-value<0.001, **p-value<0.01, ***p-value<0.05, ****p-value<0.10 (for interactions only).

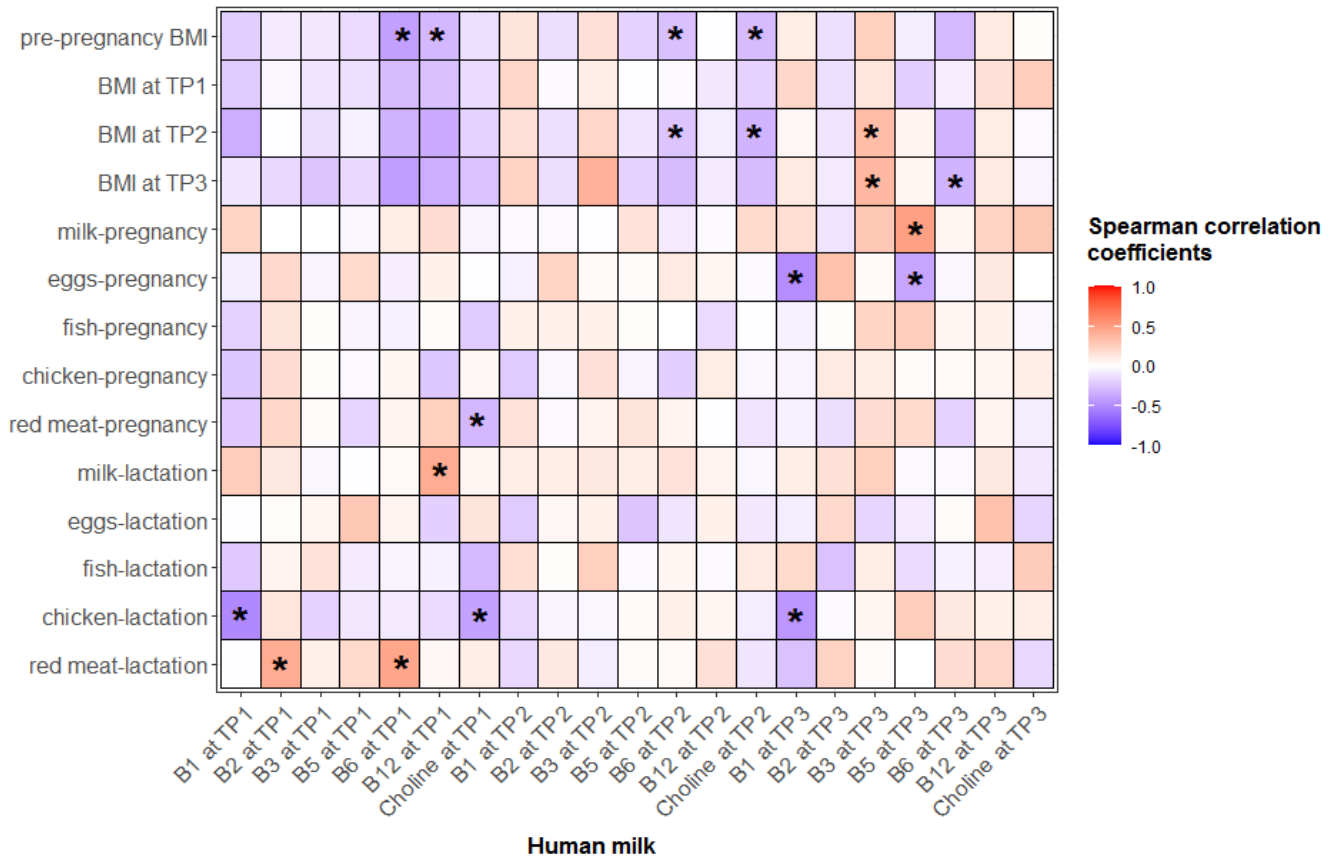

A
Thiamin (µg/L)
Riboflavin (µg/L)
Niacin (µg/L)
Pantothenic acid (µg/L)
B-6 (µg/L)
B-12 (pmol/L)
Choline (mg/L)
Postpartum days



Supplemental Figure 1. B-vitamin and choline concentrations in human milk. **A**: Box plot of B-vitamin and choline concentrations between 2 and 8 days. **B**: Comparison of B-vitamin and choline concentrations among postpartum visits.

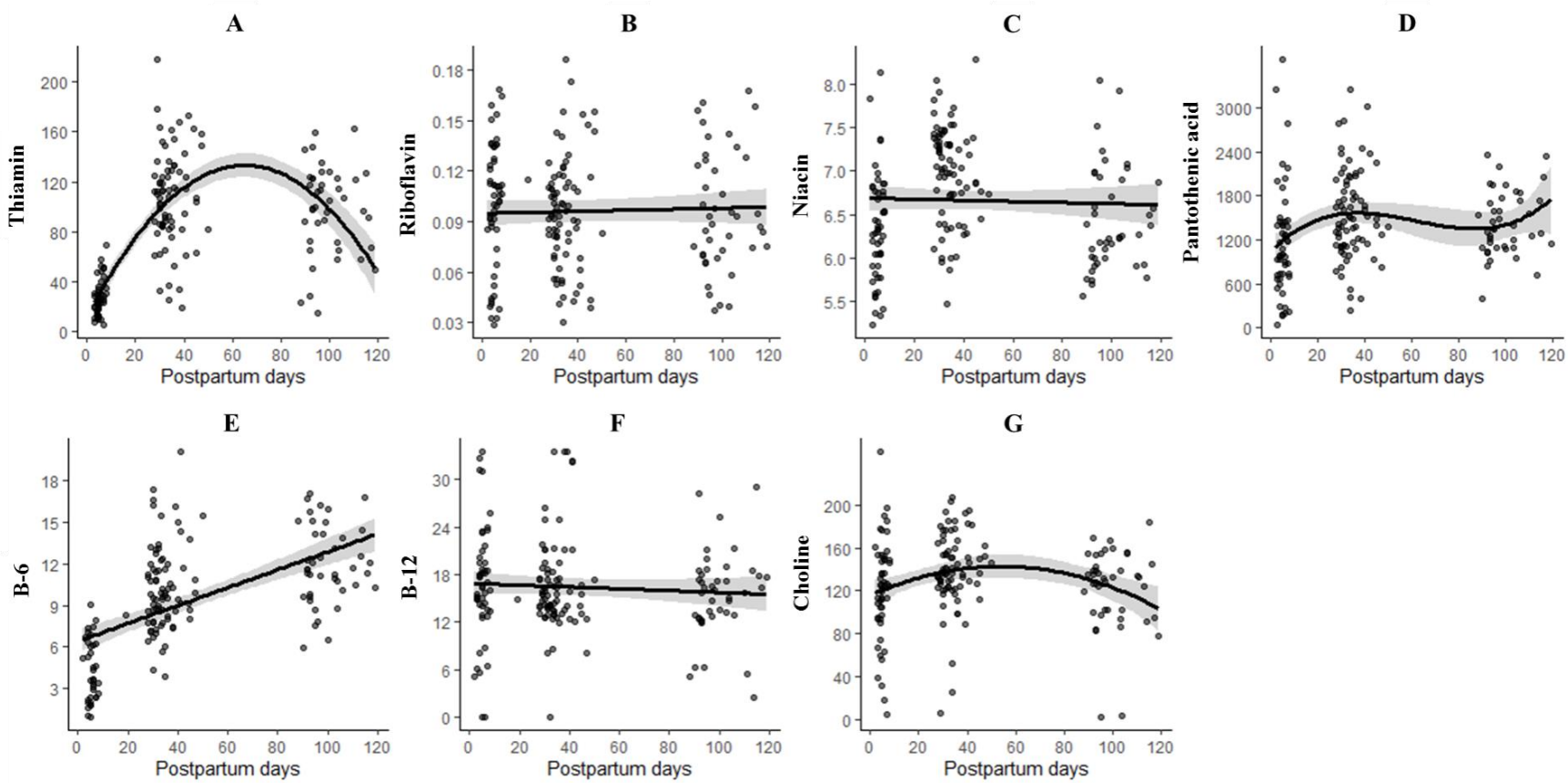
Notes: #= p-value<0.01 for Skillings–Mack test (comparison of B-vitamin and choline concentrations among three postpartum visits). NS= Not Significant; *=p-value<0.05; ***=p-value<0.001 for Wilcoxon matched-pairs signed-rank test (comparison of B-vitamin and choline concentrations among each pair of postpartum visits). Range of the number of observations for each day in figure 2A: day 2: n= 0-1; day 3: n= 6-7; day 4: n= 8-10; day 5: n= 10-14; day 6: n= 7-10; day 7: n= 5-7; day 8: n= 2-3. Number of observations for each time point in figure 2B: 2-8 postpartum days: thiamin: n=47; riboflavin: n=52; niacin: n=52; pantothenic acid: n=52; B-6: n=36; B-12: n=50; choline: n=52. 28-50 postpartum days: thiamin: n=72;

riboflavin: n=76; niacin: n=76; pantothenic acid: n=76; B-6: n=76; B-12: n=76; choline: n=75. 88-119 postpartum days: thiamin: n=41; riboflavin: n=42; niacin: n=42; pantothenic acid: n=42; B-6: n=42; B-12: n=42; choline: n=42. Total water-soluble choline is the sum of free choline, phosphocholine, glycerophosphocholine.



Supplemental Figure 2. Spearman correlation of B-vitamin and choline concentrations in the human milk and maternal BMI and ASF intake during pregnancy and lactation.

Notes: Coloring reflects direction and magnitude of the Spearman correlation coefficients. ***** =significant correlations (p-value<0.05). Abbreviatures: ASF=animal-source food, B1: thiamin, B2: riboflavin, B3: niacin, B5: pantothenic acid, BMI= body mass index, TP1= time point visit 1 (2-8 postpartum days), TP2= time point visit 2 (28-50 postpartum days) and TP3= time point visit 3 (88-119 postpartum days). Total water-soluble choline is the sum of free choline, phosphocholine, glycerophosphocholine.



Supplemental Figure 3. Longitudinal predictions of milk B-vitamin and choline concentrations according to postpartum days.

Notes: The beta coefficients (β) and standard error (SE) represents B-vitamin and choline in human milk trajectories according to postpartum days. **A:** β= 3.73 (0.25); p-value<0.001. Thiamin (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. **B:** β= 0.00 (0.00); p-value=0.55. Riboflavin (µg/L) was inverse square root transformed. **C:** β= -0.001 (0.001); p-value=0.62. Niacin (µg/L) was log-transformed. **D:** β= 0.338 (8.713); p-value<0.01. Pantothenic acid (µg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear, quadratic, and

cubic postpartum days. **E:** β= 0.064 (0.007); p-value<0.001. Vitamin B-6 (µg/L) was square root transformed. **F:** β= -0.011 (0.012), p-value=0.35. Vitamin B-12 (pmol/L) was square root transformed. **G:** β= 1.009 (0.338); p-value<0.01. The total water-soluble form of choline (mg/L) was not transformed, but the model was adjusted for linear and quadratic postpartum days. The total water-soluble form of choline is the sum of free choline, phosphocholine, glycerophosphocholine.

7.2 Artigo 2 (em processo de finalização para submissão no *The Journal of Nutrition*)

Associação entre sintomas de ansiedade no terceiro trimestre gestacional, estado nutricional de vitamina B-12 materno e concentrações de B-12 no leite no primeiro mês pós-parto.

Association of anxiety symptoms in the third trimester of pregnancy, maternal B-12 status and B-12 milk concentration at the first month postpartum.

RESUMO

Introdução: Sintomas depressivos e de ansiedade perinatais são um problema de saúde pública, e pouco se sabe a respeito de sua associação com biomarcadores do estado nutricional materno de vitamina B-12 e concentrações de B-12 no leite.

Objetivo: Avaliar a associação entre sintomas depressivos e de ansiedade maternos no período perinatal com as concentrações séricas de vitamina B-12 e homocisteína e de B-12 no leite.

Métodos: Oitenta e oito mulheres foram estudadas em uma coorte prospectiva com informações no terceiro trimestre da gravidez (linha de base) e duas visitas no pós-parto (*time point*-TP): 2-8 (TP1) e 28-50 (TP2) dias pós-parto. As concentrações de B-12 no leite foram mensuradas pelo imunoensaio enzimático quimioluminescente competitivo em TP1 e TP2. As concentrações séricas de B-12 e homocisteína foram avaliadas na linha de base, TP1 e TP2 por imunoensaio quimioluminescente. Os sintomas depressivos e de ansiedade foram avaliados usando a Escala de Depressão Pós-natal de Edimburgo e o Inventário de Ansiedade Traço-Estado na linha de base e no TP2. Foram realizados o teste de correlação de Spearman e a regressão linear multivariada.

Resultados: A prevalência de estado nutricional materno deficiente e marginal de vitamina B-12 foram de 3,9% e de 9,0% no TP2, respectivamente. Alta prevalência de baixas concentrações de B-12 no LH foram observadas no TP1 (53,2%) e TP2 (74.1%). As concentrações de B-12 no leite foram positivamente correlacionadas com as concentrações séricas de B-12 ($\rho = 0,26$, $P = 0,04$) e negativamente correlacionadas com as concentrações de homocisteína ($\rho = -0,36$, $P = 0,01$) no TP2. A análise multivariada revelou que para cada aumento de uma unidade na pontuação no inventario de ansiedade-estado na linha de base, as concentrações de homocisteína sérica aumentaram 0,74% (IC 95%: 0,08%, 1,40%; $P = 0,03$) e a concentrações de B-12 no leite diminuíram 2,13% (95 % CI: -3,89%, -0,34%; $P = 0,02$) no TP2.

Conclusão: A ocorrência de sintomas de ansiedade durante a gestação pode estar positivamente associada à concentração de homocisteína sérica materna e negativamente associada à concentração de B-12 no leite no primeiro mês pós-parto.

Palavras-chave: gravidez, lactação, leite humano, vitamina B12, homocisteína, ansiedade, depressão.

ABSTRACT

Background: Perinatal depressive and anxiety symptoms are a public health concern, and little is known regarding their association with maternal serum biomarkers of vitamin B-12 status and milk B-12 concentration.

Objective: To evaluate the association between maternal anxiety and depressive symptoms in the perinatal period, and serum B-12 and homocysteine concentrations, and B-12 concentration in human milk.

Methods: Eighty-eight women were studied in a prospective cohort with information at the third trimester of pregnancy (baseline) and two postpartum time-points (TP)s: 2–8d (TP1) and 28–50d (TP2) postpartum. B-12 concentrations in milk were measured by competitive chemiluminescent enzyme immunoassay at TP1 and TP2. Serum B-12 and homocysteine concentrations were evaluated at baseline, TP1, and TP2 by chemiluminescent immunoassays. Depressive and anxiety symptoms were measured with the Edinburgh Postnatal Depression Scale and the State-Trait Anxiety Inventory at baseline and TP2. Spearman's correlation test and multivariate linear regression were performed.

Results: The prevalence of vitamin B-12 deficient and marginal status were 3.9% and 9.0% at TP2. High prevalence of low milk B-12 concentration were observed at TP1 (53.2%) and TP2 (74.1%). The milk B-12 concentrations were positively correlated with serum B-12 concentrations (ρ= 0.26, P=0.04) and negatively correlated with homocysteine concentrations (ρ= -0.36, P=0.01) at TP2. Multivariate analysis revealed that each unit higher in anxiety state score at baseline were associated with higher serum homocysteine concentrations by 0.74% (95% CI: 0.08%, 1.40%; P= 0.03), and lower milk B-12 concentration by 2.13% (95% CI: -3.89%, -0.34%; P= 0.02) at TP2.

Conclusion: The occurrence of anxiety symptoms during pregnancy was positively associated with maternal serum homocysteine concentrations and negatively associated with milk B-12 concentrations at the first month postpartum.

Keywords: pregnancy, lactation, human milk, vitamin B12, homocysteine, anxiety, depression.

Introduction

Vitamin B-12 is an essential nutrient for maternal and child health. It participates as a cofactor in various metabolic processes, including the one-carbon cycle, which is essential for synthesizing DNA and amino acids (1, 2). Women of childbearing age, infants, and young children are included in the group at higher risk for B-12 insufficiency (3, 4). B-12 deficiency during pregnancy has been linked to adverse gestational outcomes and could impact the infants' fetal storage of this vitamin (5-7). Furthermore, vitamin B-12 is included in group I micronutrients in human milk; because its concentration is directly affected by maternal status (8).

There is increased interest in the relationship between maternal nutrition and her mental health in the perinatal period, and this relationship seems to be bi-directional (9). Some studies have linked inadequate intake and/or low status biomarkers of vitamins involved in the one-carbon cycle, mainly folate and B-12, in subjects with depressive and anxiety symptoms (10-13). However, most studies have been cross-sectional and mixed results were observed (4, 11). Vitamin B-12 has hematological and neurological functions and is required for S-adenosylmethionine (SAM) synthesis (4). SAM has anti-depressive properties, as it plays a role in the syntheses of neurotransmitters (14). Some studies have demonstrated that vitamin B-12 deficiency status could impair SAM synthesis and raise homocysteine levels, and thus, be related to anxiety and depressive symptoms (15, 16). It is also possible that in the opposite direction, mental health disorders could lead to micronutrient deficiencies, as they could contribute to unhealthy lifestyles (17-19). Regardless of the direction, this area is of major clinical and public health concern, given the high prevalence of maternal mental disorders in the perinatal period, mainly in low- and middle-income countries (20, 21).

Depressive and anxiety symptoms in the perinatal period are related to several maternal and child health outcomes, some of which may be related to their negative impact on breastfeeding outcomes (18, 22, 23). However, few studies have assessed the association of maternal mental health with human milk composition. Previous studies have mainly focused on mental health disorders during the postpartum period in relation to hormones and immunological factors in milk as a physiological response to stress (22, 24). Nevertheless, the relationship between maternal mental health, during pregnancy and the early postpartum period, and maternal B-12 deficiency is not well established, and little is known about their association with milk B-12 concentration. In

this study we test the primary hypotheses that 1) depressive or anxiety symptoms during pregnancy are associated with high serum homocysteine concentrations and low serum and milk B-12 concentrations postpartum; 2) milk B-12 concentrations are positively correlated with maternal serum B-12 and negatively correlated with maternal homocysteine concentrations. In addition, considering the likely bi-directional nature of this association, we also investigated the secondary hypothesis that low serum B-12 and high homocysteine concentrations in the third trimester of pregnancy are associated with more depressive and anxiety symptoms in the first mo postpartum.

Methods

This was a prospective cohort of pregnant women and their infants who received perinatal care at a public health center located in a lower-income community in Rio de Janeiro, Brazil. The study data were collected between January 2017 and January 2020. Eligibility criteria were: pregnant mother between 28 and 35 gestational wk; between 18 to 40y; with no known infectious or chronic noncommunicable diseases (except obesity); singleton pregnancy; and residence in the catchment area of the public health center.

A non-probabilistic sample of 147 pregnant women was enrolled during the study baseline when women were between 28 and 35 wk of gestation. Subsequently, eight women and their children were excluded due to stillbirth, pre-term birth, or developing a chronic or infectious disease before delivery. As a result, 139 women were followed at five follow-up visits that happened at the following time points (TPs) postpartum: 2-8 d (TP1), 28-50 d (TP2), 88-119 d (TP3), 6 mo (TP4), and 12 mo (TP5). We analyzed data from the subsample of 88 women for which we had mental health data and milk samples for at least TP1 (n=47) or TP2 (n=70) (**Supplemental Figure 1**).

Maternal mental health

Depressive and anxiety state symptoms were evaluated at baseline and TP2.

Depressive symptoms were measured with the Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS), the most common screening tool used in the perinatal period (25, 26). The EPDS is a 10-item screening questionnaire that assesses the depressive symptoms over the preceding 7 d (27,

28). Each item in this scale has four possible answers ranging from 0 to 3, with a maximum score of 30. We used a cutoff ≥11 to assess the prevalence of depressive symptoms (29).

Anxiety symptoms were measured with the Spielberger State-Trait Anxiety Inventory (STAI) that evaluates two anxiety types: anxiety as a trait and a state (30). The anxiety trait refers to stable and relatively permanent personality characteristics. The anxiety state refers to a transitory emotional state concerning a specific period. The inventory consists of 40 items separated into two distinct subscales of 20 items each, with Likert-type response options ranging from 1 to 4. The total STAI score for each subscale (state-anxiety and trait-anxiety) ranges from 20 to 80 (30). In the present study, we used anxiety state because the anxiety trait was only measured at baseline. We used the cutoff ≥40 to assess the prevalence of anxiety state symptoms (31).

The EPDS and STAI were validated in the pregnancy and postnatal periods (28, 32) and were translated and adapted for use in Brazil (33-35). Higher scores on the EPDS and STAI represent higher depressive and anxiety symptoms, respectively.

Maternal serum B-12 and homocysteine

After an 8-12 h overnight fast, maternal blood samples were collected at baseline, TP1, and TP2. The samples were collected in tubes with separator gel and centrifuged within 1 h of blood collection. Serum was separated into aliquots of 1 mL and stored at −80 °C until analysis. Serum vitamin B-12 concentrations were analyzed by chemiluminescent immunoassays in an automated system (UniCel DxI 800, Beckman Coulter, Brea, USA), and homocysteine concentrations were analyzed by chemiluminescent immunoassays in an Abbott Alinity i (Abbott Diagnostics, Chicago, USA). B-12 deficient and marginal status were defined as serum level <148pmol/L and 148- 221 pmol/L, respectively (36); serum homocysteine >12µmol/L was defined as hyperhomocysteinemia (37). These cutpoints were only used to characterize the participants' status in the postpartum period, as they overestimate the actual prevalence of B-12 deficiency in pregnancy (4). In our models, both serum vitamin B-12 and homocysteine were used as continuous variables.

Human milk collection and milk B-12 concentration analysis

Following procedures established by the Brazilian Network of Human Milk Banks protocol (38), we instructed women breastfeeding on-demand to collect milk samples at TP1 and TP2, as previously described (39). The participants collected milk, preferably in the morning after breakfast

(until ~10:00 am) considering that the concentrations of B vitamins in milk exhibit little or no diurnal variation (40). The milk samples were collected from the same breast through hand expression, because a pump could be a potential risk of contamination. For the aim of this study, it was not necessary to clean the breast. Before starting the collection, the participants were asked to wash their hands and put on masks to protect their face and head coverings to avoid possible sample contamination during the process. The trained interviewer also used the same hygiene procedures because, if necessary, they helped the participant with the milk sample extraction using nitrile gloves.

A total of 5 mL of milk was collected from each participant at TP1 and 17 mL at TP2. The samples were expressed directly into 50 mL sterile, ribonuclease (RNase)-free, deoxyribonuclease (DNase)-free, nonpyrogenic tubes. Although the breast was not fully emptied, previous studies have shown that the concentrations of water-soluble vitamins in milk remain relatively stable during the feeding episode (hind or foremilk) (40). The samples were homogenized and aliquoted immediately after collection. One aliquot of 1 mL at each of the visits was used for vitamin B-12 analyses. The samples were frozen at -20 °C and then transported in a temperature-controlled box (-1 °C to -5 °C) to Rio de Janeiro Federal University and stored at -80 °C. For analysis, the frozen samples were shipped on dry ice to the USDA/ARS-Western Human Nutrition Research Center, Davis, CA, USA. Vitamin B-12 was analyzed using the Siemens IMMULITE competitive chemiluminescent enzyme immunoassay (CV: 8.5%) as previously described (41). We classified milk B-12 concentration as low if <310 pmol/L, a cutoff proposed by Williams et al. (2016) (42) and used in previous studies (43, 44).

Covariates

A structured questionnaire was administered at baseline to collect socio-economic and demographic data such as maternal age (years), education (schooling years), marital status (with and without a partner), and parity (primiparous/multiparous). Exclusive breastfeeding status was defined as the infant received only human milk, according to the WHO definition (45).

Serum folate concentrations (ng/mL) were analyzed by chemiluminescent immunoassay in an automated system UniCel DxI 800 (Beckman Coulter, Brea, USA).

The interviewers were trained to measure height in duplicate using a stadiometer (Altura Exata, Belo Horizonte, Brazil) at TP2. When the measurements of height differed by >0.5 cm, a third measurement was performed, and the mean of the two more similar measurements was used. The self-reported pre-pregnancy weight was used to calculate the pre-pregnancy BMI (kg/m²); women were classified according to the WHO cutoffs (46) as underweight (<18.5 kg/m^2), normal (≥ 18.5 and < 25.0 kg/m^2), overweight (≥ 25.0 and < 30.0 kg/m^2) or obese (≥ 30 kg/m^2).

Statistical analyses

The distribution of continuous variables was assessed using histograms, kurtosis, and skewness measurements. We used absolute (n) and relative frequencies (%) for categorical variables and median and interquartile range (IQR) for continuous variables to describe maternal characteristics, blood biomarkers, and milk B-12 concentrations. We compared the characteristics of women with and without milk samples using the Mann–Whitney, Chi-square, and Fisher's exact tests to assess the plausibility of the assumption that data were missing completely at random,

The Spearman's rank correlation test was performed to investigate correlations between maternal B-12 and serum homocysteine concentrations during pregnancy and lactation and milk B-12 at TP1 and TP2. The correlations were interpreted as: weak (0.00 to 0.39), moderate (0.40 to 0.69), strong (0.70 to 0.89) and very strong (0.90 to 1.00) (47). The Mann–Whitney test was performed to compare milk B-12 median concentrations between women with or without anxiety and depressive symptoms.

Unadjusted and adjusted linear regression models were performed to evaluate the association between anxiety or depressive symptom scores at baseline (exposure) and maternal serum B-12 and homocysteine concentrations (outcomes), and milk B-12 concentrations (outcomes) at TP1 and TP2. Considering that our outcomes (maternal serum homocysteine concentrations and serum and milk B-12 concentrations) were skewed, the regression models have been conducted using log natural transformed variables, then, the estimates were backtransformed to be expressed as percentage change. To assess the homogeneity of variance and normality, the residuals of all regression models were plotted and evaluated. Moreover, we performed sensitivity analyses including only infants exclusively breastfed to assess the association between anxiety or depressive symptom scores and milk B-12 concentrations, considering that mental health issues could impact breastfeeding mode.

Regarding the possible bi-directional relationship between mental health and blood biomarkers, we also used linear regression models to test our secondary hypothesis. Specifically, we estimated the association between serum vitamin B-12 and homocysteine concentrations at baseline (exposure) and maternal anxiety or depressive symptom scores at TP2 (outcome).

All the models were adjusted for specific confounders selected based on biological plausibility and previous knowledge. The associations were considered statistically significant when p-values were <0.05. Statistical analyses were performed using Stata version 15 (StataCorp) and R version 4.0.3.

Ethics

The Research Ethics Committee of the Municipal Health Secretary and Civil Defense of the State of Rio de Janeiro (Protocol number: 49218115.0.0000.5275) and the Maternity School of Rio de Janeiro Federal University (Protocol number: 49218115.0.0000.5275) approved the present study. Written informed consent from all the participants was obtained freely and spontaneously after all necessary clarifications had been provided.

Results

The median maternal age was 27 (IQR: 22-31) years old, and 42% of the participants were classified with pre-pregnancy overweight or obesity. The prevalence of depressive symptoms was 35.2% at baseline and 10.0% at TP2. The prevalence of anxiety state at baseline was 39.8% and 26.6% at TP2. The prevalence of B-12 deficiency was 3.9% and the marginal status was 9.0% at TP2. The median homocysteine concentration was 6.7 (IQR: 5.9- 7.8) μmol/L, and only one case of hyperhomocysteinemia (>12 umol/L) was observed at TP2. The prevalence of low vitamin milk B-12 concentrations (<310 pmol/L) was 53.2% and 71.4% at TP1 and TP2, respectively (**Table 1**). The participants with and without milk samples were not statistically different considering maternal characteristics, serum biomarkers of status, or the presence or absence of depressive and anxiety symptoms at baseline (**Supplemental Table 1)**.

Maternal mental health and serum B-12 and homocysteine concentrations

In the multivariate linear regression, we observed that each unit higher in anxiety state score in the third trimester of pregnancy was associated to higher serum homocysteine concentrations at TP2 by 0.74% (95% CI: 0.08%, 1.40%; *P*= 0.03), even after adjusting for serum B-12, homocysteine, and folate concentration during pregnancy. The scores of EPDS and STAI in the baseline were not associated with serum B-12 concentrations at TP1 and TP2 (**Table 2**). We also tested the other direction of this relationship and observed that serum B-12 and homocysteine concentration at baseline were not associated with depressive and anxiety symptoms at TP2 (**Supplemental Table 2**).

Correlation between serum B-12 and homocysteine concentrations and milk vitamin B-12 concentration

The correlations varied between low and moderate serum B-12 values. Milk B-12 concentrations at TP1 were positively and significantly correlated with serum B-12 concentrations at baseline (ρ= 0.47, *P* <0.01) and at TP1 (ρ= 0.67, *P*<0.01). In contrast, they were negatively and significantly correlated with homocysteine at TP1 (ρ= -0.38, *P* =0.04). Milk B-12 concentrations at TP2 were positively and significantly correlated with serum B-12 levels at TP1 (ρ= 0.44, *P* =0.03) and TP2 (ρ= 0.26, *P* =0.04); and were negatively and significantly correlated with homocysteine at TP2 (ρ= -0.36, *P* =0.01) (data not shown).

Association between maternal mental health and milk vitamin B-12 concentration

We found statistically significant lower median concentrations of B-12 in milk at TP2 in participants with state anxiety at baseline. However, median milk B-12 concentrations medians were not different between participants with or without depressive symptoms (**Figure 1** and **Supplemental Table 3**).

In the multivariate analyses, each unit higher in anxiety state score at baseline was associated with lower milk B-12 concentrations at TP2 by 2.13% (95% CI: -3.89%, -0.34%; *P* = 0.02), even after adjustment for selected confounders (**Table 3**).

Baseline EPDS and STAI were not associated with milk B-12 concentrations at TP1. Additionally, EPDS and STAI scores at TP2 were not associated with milk B-12 concentration (**Table 3**). Results remained the same in the sensitivity analyses that only included exclusively breastfed infants (data not shown).

Discussion

We observed that higher anxiety state scores at the third trimester of pregnancy were associated with higher serum homocysteine concentrations and lower milk B-12 concentrations in the first mo postpartum, even after adjusting for potential confounders. The milk B-12 concentrations in the first mo postpartum were positively correlated with serum B-12 concentrations and negatively correlated with homocysteine concentrations. We could not confirm our primary hypothesis predicting an association between depressive and anxiety symptoms in the third trimester of pregnancy and postpartum serum B-12 concentrations.

In our study, we found a high prevalence of low milk B-12 concentration (<310 pmol/L) at TP1 (53.2%) and TP2 (74.1%). The prevalence of low values at TP2 was similar to that found in previous studies conducted in low-middle income countries, including lactating women residing in rural Kenya (89%, ~ at 6 to 12 mo) and urban Tanzania (70%, ~ at 6 wk postpartum) (42, 44). However, our prevalence was higher compared with previous studies conducted in lactating women in the United States (below 20%) and Norway (38%) (43, 48). Our finding regarding the low-to-moderate positive correlation of maternal serum vitamin B-12 (ρ= 0.44, at TP1; ρ= 0.26, at TP2) and the negative correlation of serum homocysteine (ρ= -0.36, at TP2) with milk B-12 concentrations is in line with a previous study. Bae et al. (37) reported, based on data from a feeding trial study with 28 lactating women in the US, that milk B-12 concentration was moderately positively correlated with maternal vitamin serum B-12 concentration (r = 0.48) and also tended to be inversely correlated with maternal serum homocysteine (r = −0.34) at five wk postpartum.

Pregnancy and lactation are characterized by increased nutrients requirements for women; thus, these are considered stages at which women are at higher risk of B-12 insufficiency (4). Additionally, a decrease in the serum B-12 concentration of ~25-30% is expected through pregnancy, which has been assumed to be a normal physiological response (37, 49, 50). However, serum B-12 concentrations by themselves may not be sufficiently accurate to confirm or refute this assumption, hence other biomarkers have been suggested (4, 51). For example, homocysteine levels have been used as a sensitive marker of folate and vitamin B12 deficiency (52). In countries with mandatory flour fortification with folic acid, homocysteine is likely to be an accepted

biomarker for B-12 deficiency (53). Nevertheless, previous studies also showed that the homocysteine concentrations change during pregnancy and lactation (37).

Our study explored the bi-directional relationship between mental health distress and serum B-12 and homocysteine concentration in the perinatal period. Our results highlight that anxiety state at the third of pregnancy was positively associated with maternal homocysteine levels at approximately one mo postpartum, even after adjusting for serum B-12, folate, and homocysteine concentration in the end of pregnancy. However, we did not observe an association between mental health distress in the third trimester of pregnancy and postpartum serum B-12 concentrations. The opposite direction of this relationship was also investigated, and we found no association between serum B-12 and homocysteine at the third trimester of pregnancy and maternal distress in the first mo postpartum. Our result is in line with a previous cohort study conducted in Singapore that did not observe an association between maternal B-12 concentrations at 26th and 28th gestational wk and depressive symptoms during pregnancy and postpartum (10).

We also observed that the increase in anxiety state scores was associated with lower milk B-12 concentrations in the first mo postpartum, even after adjusting for maternal prepregnancy BMI, serum B-12, and homocysteine concentrations at baseline. However, there is a paucity of studies evaluating maternal mental health and milk composition, and, to our knowledge, only one study has previously evaluated the association with vitamin concentrations in human milk (24). That cross-sectional study focused on vitamin B-6, only evaluated postpartum depressive symptoms, used a different instrument, and had a smaller sample size than our study (n=25 lactating women), making it difficult to compare with our findings (54).

Maternal anxiety or depressive symptoms during pregnancy may promote unhealthy maternal behaviors, increasing the risk of maternal B-12 deficiency and low milk B-12 concentration. All these findings reinforce the need for maternal health promotion, considering that poor health conditions could influence maternal vitamin status and, thus, may contribute to an increase in the prevalence of vitamin B-12 deficiency in infants through low breast milk concentrations, as previously demonstrated (55, 56).

The strengths of this study included the use of blood status biomarker concentrations, which are more accurate and free of the self-reported bias related to the conventional methods of dietary assessments that could under-or overestimate our results. Second, we adjusted our models for

serum folate concentration involved in the one-carbon cycle, which could impact homocysteine and B-12 concentrations and maternal mental health. Furthermore, the prospective design of the study made it possible to evaluate the bi-directional relationship between maternal mental health and blood B-12 and homocysteine concentration; and the relationship with milk B-12 concentrations across two time-points in the first mo postpartum.

We acknowledge that our study has some limitations. First, homocysteine levels could be impacted by other vitamin deficiencies and pathological conditions. To minimize this confounder, we adjusted our models for serum folate concentrations and only followed healthy women (without any chronic, except obesity, or infectious diseases). Our study could have benefitted from having measured holotranscobalamin, because it is a more specific biomarker of B-12 deficiency at the end of pregnancy, or by using a combination of other B-12 status biomarkers. Although we have adjusted our models for important confounders, we cannot rule out residual confounders by other factors such as genetics that may be linked to both maternal mental health distress and vitamin B-12 and homocysteine concentrations. Our study also raises the possibility that postpartum homocysteine concentration could mediate the relationship between anxiety state during pregnancy and milk B-12 concentration. However, studies with a large sample size, including more participants with Hyperhomocysteinemia, are needed to perform mediation analysis and confirm this new hypothesis. Finally, our study was conducted in only one public health center, limiting the generalization of our findings.

In conclusion, we observed a high prevalence of low milk B-12 concentrations, and that maternal serum B-12 and homocysteine concentrations were correlated with this milk B-12 concentration. Importantly, our study showed that a higher score on anxiety symptoms during pregnancy was related to lower milk B-12 concentration, regardless of the serum B12 and homocysteine concentrations at the third trimester of pregnancy. However, large clinical trials are needed to better explain the mechanisms by which maternal mental health disorders could be related to human milk vitamin composition.

References

1. Rush EC, Katre P, Yajnik CS. Vitamin B12: one carbon metabolism, fetal growth and programming for chronic disease. Eur J Clin Nutr 2014;68:2-7.
2. Finkelstein JL, Layden AJ, Stover PJ. Vitamin B-12 and perinatal health. Adv Nutr 2015;6:552-63.
3. Green R, Allen LH, Bjorke-Monsen AL, Brito A, Gueant JL, Miller JW, Molloy AM, Nexo E, Stabler S, et al. Vitamin B12 deficiency. Nat Rev Dis Primers 2017;3:17040.
4. Allen LH, Miller JW, De Groot L, Rosenberg IH, Smith AD, Refsum H, Raiten DJ. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND): vitamin B-12 review. J Nutr 2018;148:1995S-2027S.
5. Allen LH. Vitamin B 12 metabolism and status during pregnancy, lactation and infancy. Nutrient regulation during pregnancy, lactation, and infant growth. Adv Exp Med Biol 1994 ;352:173-86.
6. Rogne T, Tielemans MJ, Chong MF-F, Yajnik CS, Krishnaveni GV, Poston L, Jaddoe VW, Steegers EA, Joshi S, Chong Y-S. Maternal vitamin B12 in pregnancy and risk of preterm birth and low birth weight: A systematic review and individual participant data meta-analysis. Am J Epidemiol 2017;185(3):212-223.
7. Behere RV, Deshmukh AS, Otiv S, Gupte MD, Yajnik CS. Maternal Vitamin B12 Status During Pregnancy and Its Association With Outcomes of Pregnancy and Health of the Offspring: A Systematic Review and Implications for Policy in India. Front Endocrinol (Lausanne) 2021;12:619176.
8. Allen L. Maternal micronutrient malnutrition: effects on breast milk and infant nutrition, and priorities for intervention. SCN news. 1994;11:21-4.
9. Khan R, Waqas A, Bilal A, Mustehsan ZH, Omar J, Rahman A. Association of Maternal depression with diet: A systematic review. Asian J Psychiatr 2020;52:102098.
10. Chong MF, Wong JX, Colega M, Chen L-W, van Dam RM, Tan CS, Lim AL, Cai S, Broekman BF, Lee YS. Relationships of maternal folate and vitamin B12 status during pregnancy with perinatal depression: The GUSTO study. J Psychiatr Res 2014;55:110-6.
11. Sparling TM, Nesbitt RC, Henschke N, Gabrysch S. Nutrients and perinatal depression: a systematic review. J Nutr Sci 2017; 6:e61. [cited 2021 Aug 5]. Available from: doi: 10.1017/jns.2017.58
12. Peppard L, Oh KM, Gallo S, Milligan R. Risk of depression in pregnant women with low-normal serum Vitamin B12. Res Nurs Health 2019;42(4):264-272.
13. Dhiman P, Pillai RR, Wilson AB, Premkumar N, Bharadwaj B, Ranjan VP, Rajendiran S. Cross-sectional association between vitamin B12 status and probable postpartum depression in Indian women. BMC Pregnancy Childbirth 2021;21(1):146.
14. Mischoulon D, Fava M. Role of S-adenosyl-L-methionine in the treatment of depression: a review of the evidence. Am J Clin Nutr 2002;76:1158S-61S.
15. Folstein M, Liu T, Peter I, Buel J, Arsenault L, Scott T, Qiu WW. The homocysteine hypothesis of depression. Am J Psychiatry 2007;164(6):861-7.
16. Moradi F, Lotfi K, Armin M, Clark CC, Askari G, Rouhani MH. The association between serum homocysteine and depression: A systematic review and meta-analysis of observational studies. Eur J Clin Invest 2021;51(5):e13486.
17. Barker ED, Kirkham N, Ng J, Jensen SK. Prenatal maternal depression symptoms and nutrition, and child cognitive function. Br J Psychiatry 2013;203(6):417-21.

18. Saeed A, Raana T, Saeed AM, Humayun A. Effect of antenatal depression on maternal dietary intake and neonatal outcome: a prospective cohort. J Nutr 2015;15:1-9.
19. Boutté AK, Turner-McGrievy GM, Wilcox S, Liu J, Eberth JM, Kaczynski AT. Associations of maternal stress and/or depressive symptoms with diet quality during pregnancy: a narrative review. Nutr Rev 2021;79:495-517.
20. Howard LM, Molyneaux E, Dennis C-L, Rochat T, Stein A, Milgrom J. Non-psychotic mental disorders in the perinatal period. Lancet 2014;384:1775-88.
21. Howard LM, Khalifeh H. Perinatal mental health: a review of progress and challenges. World Psychiatry 2020;19:313-27.
22. Fallon V, Groves R, Halford JCG, Bennett KM, Harrold JA. Postpartum anxiety and infant-feeding outcomes: a systematic review. J Hum Lact 2016;32(4):740-758.
23. Coo S, García MI, Mira A, Valdés V. The role of perinatal anxiety and depression in breastfeeding practices. Breastfeeding Med 2020;15:495-500.
24. Di Benedetto MG, Bottanelli C, Cattaneo A, Pariante CM, Borsini A. Nutritional and immunological factors in breast milk: A role in the intergenerational transmission from maternal psychopathology to child development. Brain Behav Immun 2020;85:57-68.
25. Hewitt CE, Gilbody SM, Mann R, Brealey S. Instruments to identify post-natal depression: which methods have been the most extensively validated, in what setting and in which language? Int J Psychiatry Clin Pract 2010;14(1):72-6.
26. O'Connor E, Rossom RC, Henninger M, Groom HC, Burda BU. Primary care screening for and treatment of depression in pregnant and postpartum women: evidence report and systematic review for the US Preventive Services Task Force. JAMA 2016;315(4):388-406.
27. Cox JL, Holden JM, Sagovsky R. Detection of postnatal depression: development of the 10-item Edinburgh Postnatal Depression Scale. Br J Psychiatry 1987;150:782-6.
28. Murray D, Cox JL. Screening for depression during pregnancy with the Edinburgh Depression Scale (EDDS). J Reprod Infant Psychol 1990;8:99-107.
29. Levis B, Negeri Z, Sun Y, Benedetti A, Thombs BD. Accuracy of the Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS) for screening to detect major depression among pregnant and postpartum women: systematic review and meta-analysis of individual participant data. BMJ 2020;371:m4022.
30. Spielberger CD, Gorsuch R, Lushene R, Vagg P, Jacobs G. State-trait anxiety inventory. Palo Alto. CA: Mind Garden. 1983.
31. Farias DR, Carrilho TRB, Freitas-Costa NC, Batalha MA, Gonzalez M, Kac G. Maternal mental health and gestational weight gain in a Brazilian Cohort. Sci Rep 2021;11(1):10787.
32. Tendais I, Costa R, Conde A, Figueiredo B. Screening for depression and anxiety disorders from pregnancy to postpartum with the EPDS and STAI. Span J Psychol 2014;17:E7. [cited 2021 Aug 5]. Available from: doi: 10.1017/sjp.2014.7.
33. Biaggio AMB, Natalício L, Spielberger CD. Desenvolvimento da forma experimental em português do Inventário de Ansiedade Traço-Estado (IDATE) de Spielberger. Arquivos brasileiros de psicologia aplicada. 1977;29:31-44.
34. Biaggio A, Natalicio L. Manual para o Inventario de Ansiedade Traço-Estado (IDATE)[State-Trait Anxiety Inventory Manual]. Rio De Janeiro: Centro de Psicologia Aplicada. 1979.
35. Santos IS, Matijasevich A, Tavares BF, Barros AJ, Botelho IP, Lapolli C, Magalhães PVdS, Barbosa APPN, Barros FC. Validation of the Edinburgh Postnatal Depression

Scale (EPDS) in a sample of mothers from the 2004 Pelotas Birth Cohort Study. Cad Saude Publica 2007; 23(11):2577-88.
36. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington (DC): National Academy Press; 1998.
37. Bae S, West AA, Yan J, Jiang X, Perry CA, Malysheva O, Stabler SP, Allen RH, Caudill MA. Vitamin B-12 status differs among pregnant, lactating, and control women with equivalent nutrient intakes. J Nutr 2015;145:1507-14.
38. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Banco de Leite Humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Brasilia, Brazil: ANVISA; 2008.
39. Batalha MA, Ferreira AL, Freitas-Costa NC, Figueiredo AC, Carrilho TR, Shahab-Ferdows S, Hampel D, Allen LH, Pérez-Escamilla R, Kac G. Factors associated with longitudinal changes in B-vitamin and choline concentrations of human milk. Am J Clin Nutr 2021; nqab191. [cited 2021 Aug 10]. Available from: https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab191
40. Allen LH, Hampel D. Water-soluble vitamins in human milk factors affecting their concentration and their physiological significance. Human Milk: Composition, Clinical Benefits and Future Opportunities. Nestle Nutr Inst Workshop Ser 2019;90:69-81.
41. Hampel D, Shahab-Ferdows S, Domek JM, Siddiqua T, Raqib R, Allen LH. Competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for vitamin B12 analysis in human milk. Food Chem 2014;153:60–5.
42. Williams AM, Chantry CJ, Young SL, Achando BS, Allen LH, Arnold BF, Colford Jr JM, Dentz HN, Hampel D, Kiprotich MC. Vitamin B-12 concentrations in breast milk are low and are not associated with reported household hunger, recent animal-source food, or vitamin B-12 intake in women in rural Kenya. J Nutr 2016;146:1125-31.
43. Pawlak R, Vos P, Shahab-Ferdows S, Hampel D, Allen LH, Perrin MT. Vitamin B-12 content in breast milk of vegan, vegetarian, and nonvegetarian lactating women in the United States. Am J Clin Nutr 2018;108:525-31.
44. Lweno ON, Sudfeld CR, Hertzmark E, Manji KP, Aboud S, Noor RA, Masanja H, Salim N, Shahab-Ferdows S, Allen LH. Vitamin B12 is low in milk of early postpartum women in urban Tanzania, and was not significantly increased by high dose supplementation. Nutrients. 2020;12:963.
45. World Health Organization. Indicators for assessing infant and young child feeding practices: Definitions and measurement methods. Geneva, Switzerland: WHO; 2021.
46. World Health Organization. Maternal anthropometry and pregnancy outcomes: a WHO collaborative study. Geneva, Switzerland: WHO; 1995.
47. Overholser BR, Sowinski KM. Biostatistics primer: part 2. Nutrition in Clinical Practice. 2008;23:76-84.
48. Henjum S, Manger M, Hampel D, Brantsæter AL, Shahab-Ferdows S, Bastani NE, Strand TA, Refsum H, Allen LH. Vitamin B12 concentrations in milk from Norwegian women during the six first months of lactation. Eur J Clin Nutr 2020;74:749-56.
49. Visentin CE, Masih SP, Plumptre L, Schroder TH, Sohn K-J, Ly A, Lausman AY, Berger H, Croxford R, Lamers Y. Low serum vitamin B-12 concentrations are prevalent in a cohort of pregnant Canadian women. J Nutr 2016;146:1035-42.
50. Hure AJ, Collins CE, Smith R. A longitudinal study of maternal folate and vitamin B12 status in pregnancy and postpartum, with the same infant markers at 6 months of age. Matern Child Health J 2012;16(4):792-801.

51. Carmel R. Diagnosis and management of clinical and subclinical cobalamin deficiencies: why controversies persist in the age of sensitive metabolic testing. Biochimie. 2013;95:1047-55.
52. Bottiglieri T. Homocysteine and folate metabolism in depression. Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry 2005;29:1103-12.
53. Green R, Miller JW. Vitamin B12 deficiency is the dominant nutritional cause of hyperhomocysteinemia in a folic acid-fortified population. Clin Chem Lab Med 2005;43(10):1048-51.
54. Boylan LM, Hart S, Porter KB, Driskell JA. Vitamin B-6 content of breast milk and neonatal behavioral functioning. J Am Diet Assoc 2002;102(10):1433-8.
55. Williams AM, Stewart CP, Shahab-Ferdows S, Hampel D, Kiprotich M, Achando B, Lin A, Null CA, Allen LH, Chantry CJ. Infant serum and maternal milk vitamin b-12 are positively correlated in Kenyan infant-mother dyads at 1–6 months postpartum, irrespective of infant feeding practice. J Nutr 2018;148:86-93.
56. Varsi K, Ueland PM, Torsvik IK, Bjørke-Monsen A-L. Maternal serum cobalamin at 18 weeks of pregnancy predicts infant cobalamin status at 6 months—A prospective, observational study. J Nutr 2018;148:738-45.

Table 1. Characteristics, biomarkers, and human milk concentrations of participants.

Characteristic	Values[1]
Maternal age (n=88)	27 (22; 31)
Education (years) (n=87)	12 (10; 12)
Parity (n=88)	
Primiparous	48 (54.6)
Multiparous	40 (45.4)
Marital status (n=88)	
With a partner	72 (81.2)
Without a partner	16 (18.2)
Pre-pregnancy BMI (kg/m²) (n=88)	
Underweight (<18.5)	3 (3.4)
Normal weight (18.5-24.9)	48 (54.6)
Overweight (25.0-29.9)	28 (31.8)
Obesity (≥30.0)	9 (10.2)
Maternal mental health at 3rd trimester of pregnancy	
Edinburgh Postnatal Depression Scale scores (n=88)	9 (6;12)
Edinburgh Postnatal Depression Scale categories (n=88)	
≥11	31 (35.2)
<11	57 (64.8)
State-Trait Anxiety Inventory scores (n=88)	37 (33; 43)
State-Trait Anxiety Inventory categories (n=88)	
≥40	35 (39.8)
<40	53 (60.2)

Maternal mental health at 28-50 postpartum days	
Edinburgh Postnatal Depression Scale scores (n=80)	6 (3; 8)
Edinburgh Postnatal Depression Scale categories (n=80)	
≥11	8 (10.0)
<11	72 (90.0)
State-Trait Anxiety Inventory scores (n=79)	35 (32; 40)
State-Trait Anxiety Inventory categories (n=79)	
≥40	21 (26.6)
<40	58 (73.4)
Blood biomarkers at 3rd trimester of pregnancy	
Vitamin B-12 (pmol/L)	172.0 (143.0; 233.0)
Homocysteine (μmol/L) (n=80)	4.6 (3.7; 5.4)
Folate (ng/mL) (n=81)	10.0 (7.4; 14.0)
Serum biomarkers at 2-8 postpartum days	
Vitamin B-12 (pmol/L) (n=33)	211.0 (147.0; 287.0)
Homocysteine (μmol/L) (n=33)	7.1 (5.6; 8.6)
Serum biomarkers at 28-50 postpartum days	
Vitamin B-12 (pmol/L) (n=78)	310.0 (249.0; 391.0)
Vitamin B-12 deficient status (<148 pmol/L) (n=78)	3 (3.9)
Vitamin B-12 marginal status (148- 221 pmol/L) (n=78)	7 (9.0)
Homocysteine (μmol/L) (n=78)	6.7 (5.9; 7.8)
Hyperhomocysteinemia (>12 μmol/L) (n=78)	1 (1.3)
B-12 human milk concentrations at various time points	
At 2-8 postpartum days (n=47)	270.2 (199.2; 406.8)
Low concentration[2] (<310 pmol/L) at 2-8 postpartum days	25 (53.2)

At 28-50 postpartum days (n=70)	239.2 (184.2; 345.1)
Low concentration[2] (<310 pmol/L) at 28-50 postpartum days	50 (71.4)
Breastfeeding status[2]	
Exclusive at 2-8 postpartum days (n=47)	42 (89.4)
Exclusive at 28-50 postpartum days (n=70)	46 (66.7)

Notes:
[1]Values are medians (interquartile range) or number of participants (%).
[2]Exclusive breastfeeding is defined as no other food or drink except breast milk (WHO, 2008).

Table 2. Association between maternal mental health at 3rd trimester of pregnancy and postpartum serum concentrations of B-12 and homocysteine.[1]

Mental health at 3rd trimester of pregnancy	**Mean % difference (95% IC) in serum concentration for each unit higher in mental health instruments scores[1]**							
	B-12 (pmol/L)[2]				Homocysteine (µmol/L)[3]			
	at 2-8 postpartum days	P	at 28-50 postpartum days	P	at 2-8 postpartum days	P	at 28-50 postpartum days	P
Depressive symptoms[4]	2.54 (-0.33; 5.50)	0.08	0.59 (-0.87; 2.08)	0.42	0.41 (-1.64; 2.49)	0.69	0.74 (-0.45; 1.95)	0.22
Anxiety state[5]	-0.11 (-1.75; 1.55)	0.89	-0.57 (-1.46; 0.32)	0.20	0.51 (-0.49; 1.51)	0.31	0.74 (0.08; 1.40)	0.03*

Notes: *P < 0.05.

[1]Regressions were performed with the log-transform of the serum B-12 or homocysteine concentration as the outcome and mean differences (95% CI) were back-transformed and reported as % differences.

[2] Models were adjusted for maternal age, education, marital status, prepregnancy BMI, and serum B-12 and folate concentration at the 3rd trimester of pregnancy.

[3] Models were adjusted for serum B-12, homocysteine, and folate concentration at the 3rd trimester of pregnancy.

[4] Depressive symptoms scores at 3rd trimester of pregnancy were assessed using the Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS).

[5] Anxiety state scores at 3rd trimester of pregnancy was assessed using the State-Trait Anxiety Inventory (STAI).

Table 3. Association between maternal mental health at 3rd trimester of pregnancy and at 28-50 postpartum days and B-12 milk concentrations.

	Mean % difference (95% IC) in milk B-12 concentration for each unit higher in mental health instruments scores[1]			
	Depressive symptoms at 3rd trimester of pregnancy [2]	*P*[1]	Anxiety state at 3rd trimester of pregnancy [3]	*P*[1]
At 2-8 postpartum days (n=44)				
Unadjusted model	0.70 (-4.26; 5.92)	0.78	-0.95 (-3.57; 1.75)	0.48
Adjusted model 1[4]	0.55 (-5.24; 6.69)	0.85	-0.61 (-3.42; 2.89)	0.67
At 28-50 postpartum days (n=61)				
Unadjusted model	-0.86 (-3.80; 2.17)	0.57	-1.88 (-3.53; -0.20)	0.03*
Adjusted model 1[4]	-1.90 (-5.21; 1.52)	0.27	-2.13 (-3.89; -0.34)	0.02*
	Depressive symptoms at 28-50 postpartum days [2]	*P*[1]	Anxiety state at 28-50 postpartum days [3]	*P*[1]
At 28-50 postpartum days (n=61)				
Unadjusted model	-2.05 (-5.61; 1.64)	0.27	-0.41 (-2.36; 1.59)	0.68
Adjusted model 1[5]	-3.34 (-7.57; 1.08)	0.13	0.07 (-2.10; 2.28)	0.95

Notes: *P < 0.05.

[1]Regressions were performed with the log-transform of the B-12 milk concentration as the outcome and mean differences (95% CI) were back-transformed and reported as % differences.

[2] Depressive symptoms scores at 3rd trimester of pregnancy were assessed using the Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS).

[3] Anxiety state scores at 3rd trimester of pregnancy were assessed using the State-Trait Anxiety Inventory (STAI).

[4] Model adjusted for pre-pregnancy BMI and serum B-12 and homocysteine concentrations at 3rd trimester of pregnancy.

[5] Model adjusted for pre-pregnancy BMI, mental health at 3rd trimester of pregnancy (EPDS/STAI scores), and serum B-12 and homocysteine concentrations at 28-50 d postpartum.

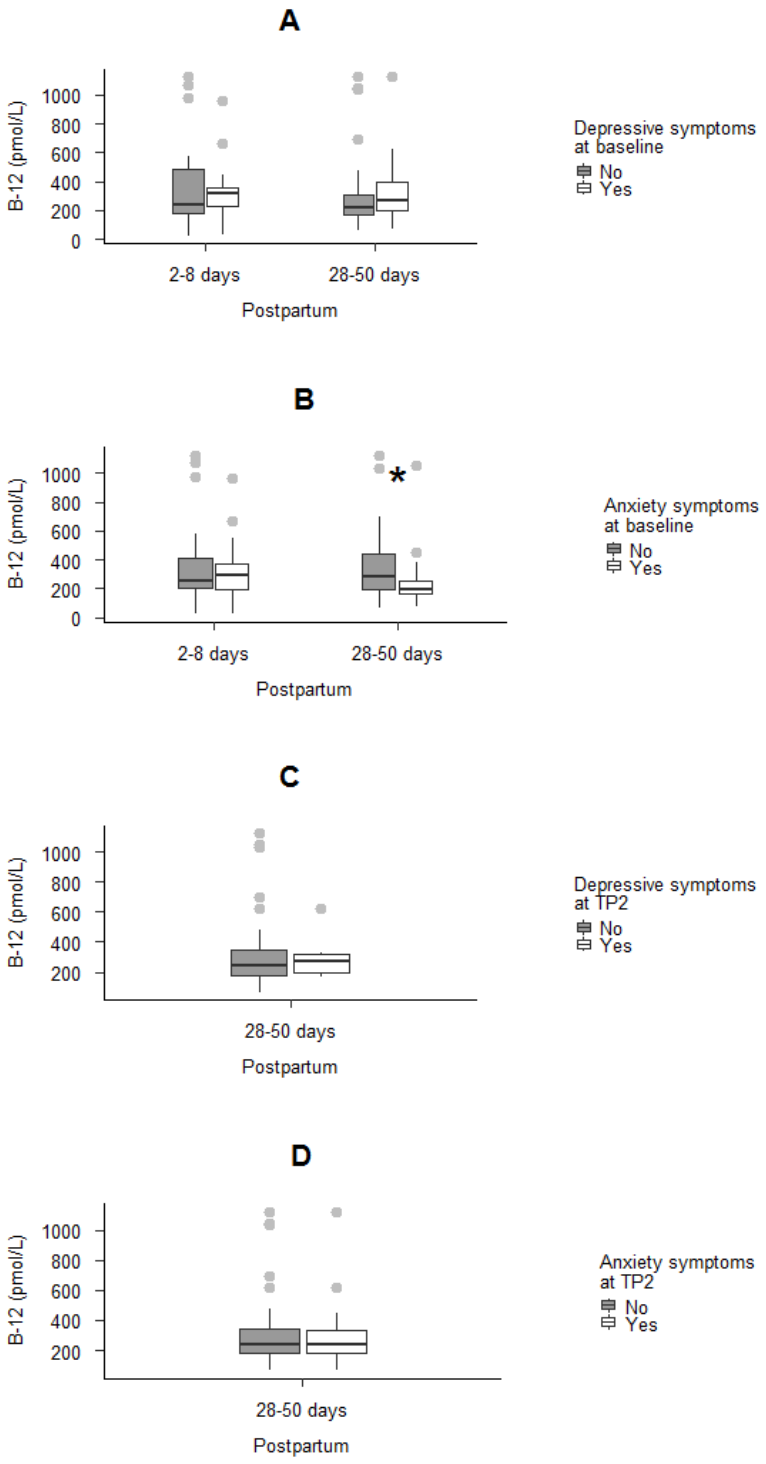


Figure 1. B-12 milk medians concentrations according to the maternal mental health status.

Notes: *P < 0.05. Mann-Whitney's test was performed to compare B-12 milk medians (IQR) between women with and without depressive or anxiety symptoms at 3rd trimester of pregnancy (baseline) and at 28-

50 postpartum days [time point (TP)2]. Depressive symptoms were assessed by the Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS), cutoff ≥11. Anxiety state were assessed by the State-Trait Anxiety Inventory, cutoff ≥40. **A:** Depressive symptoms at baseline: 2-8 postpartum days, n=47; 28-50 postpartum days, n=70. **B:** Anxiety symptoms at baseline: 2-8 postpartum days, n=47; 28-50 postpartum days, n=70. **C:** Depressive symptoms at TP2: 28-50 postpartum days, n=70. **D:** Anxiety symptoms at TP2: 28-50 postpartum days, n=70.

Supplemental Table 1. Baseline characteristics of women followed in the Brazilian cohort.

	Women with milk samples (n=88)		**Women without milk samples (n=51)**		
	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)	p[1]
Serum vitamin B-12 (pmol/L)	81	172.0 (143.0-233.0)	36	171.5 (140.0-225.5)	0.61
Serum homocysteine (µmol/L)	80	4.7 (3.7-5.4)	36	4.7 (3.9- 5.5)	0.57
	n	%	n	%	p[2]
Maternal age (years)					0.35
<30	57	64.8	37	72.5	
≥ 30	31	35.2	14	27.5	
Education (years)					0.40
≤ 12	76	87.4	46	92.0	
> 12	11	12.6	4	8.0	
Depressive symptoms[3]					0.72
Yes	31	35.2	18	38.3	
No	57	64.8	29	61.7	
Anxiety state[4]					0.94
Yes	35	39.8	19	40.4	
No	53	60.2	28	59.6	

[1]Mann-Whitney's test
[2] Chi-square or Fisher's exact test
[3] Depressive symptoms were assessed by the Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS) at 3rd trimester of pregnancy.
[4] Anxiety state were assessed by the State-Trait Anxiety Inventory at 3rd trimester of pregnancy.

Supplemental Table 2. Association between serum concentrations of B-12 and homocysteine at 3rd trimester of pregnancy and postpartum maternal mental health.

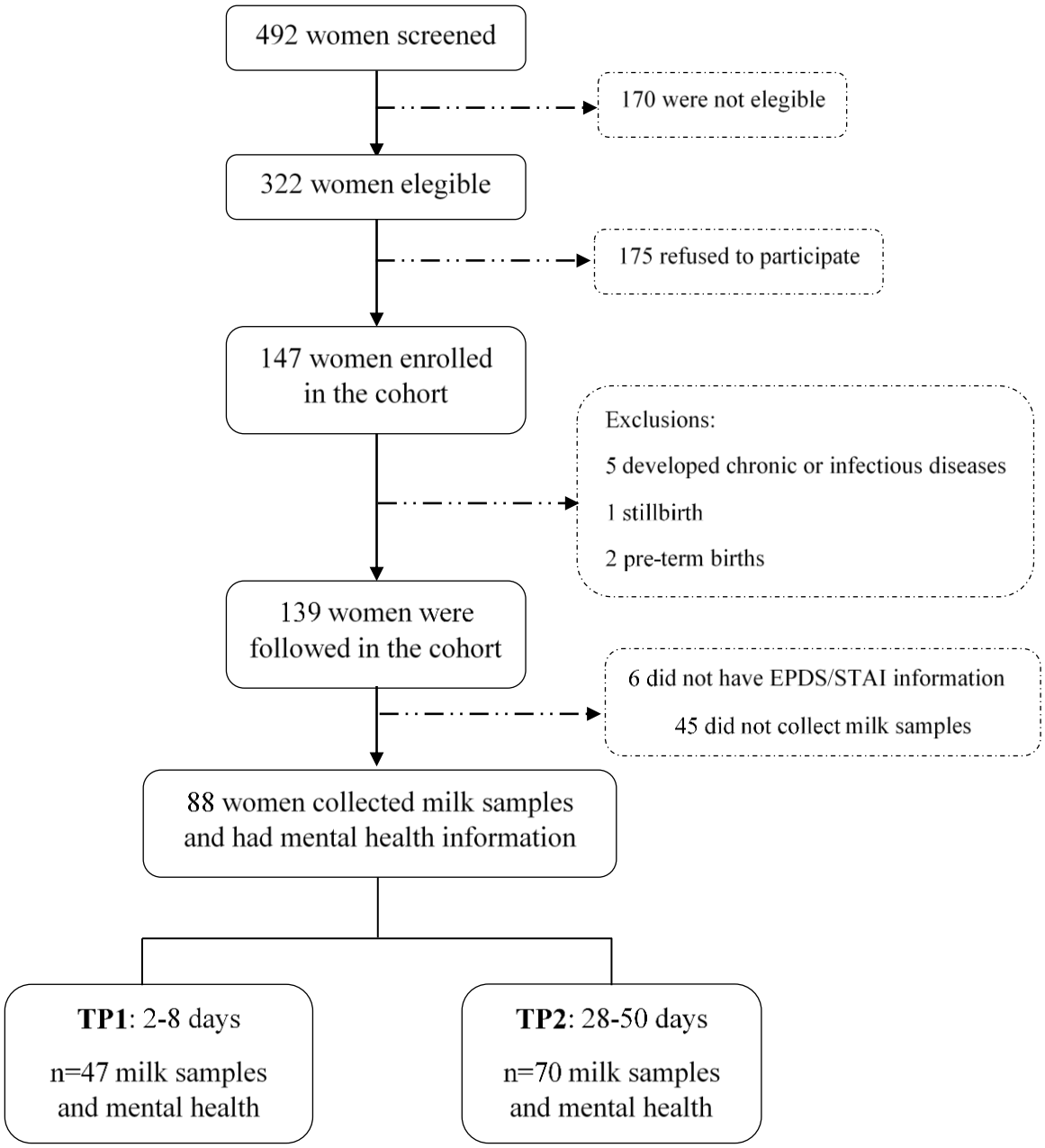
	Mental health at 28-50 postpartum days[1]			
	Edinburgh postnatal depression scale (EPDS) scores β (95% IC)	*P*[1]	Spielberg state-trait anxiety inventory (STAI) scores β (95% IC)	*P*[1]
Biomarkers at 3rd trimester of pregnancy				
B-12 (pmol/L) (n=74)[2]	0.01 (-0.01; 0.02)	0.41	0.02 (-0.00; 0.05)	0.09
Homocysteine (μmol/L) (n=73)[3]	-0.13 (-0.88; 0.62)	0.73	-0.12 (-1.28; 1.04)	0.84

Notes:
[1] Linear regression analysis between serum B-12 or homocysteine concentration and EPDS or STAI scores.
[2]Model adjusted for prepregnancy BMI, maternal age, education, marital status, serum folate concentration, and anxiety or depressive symptoms at the 3rd trimester of pregnancy.
[3]Model adjusted for serum B-12 and folate, and anxiety or depressive symptoms at the 3rd trimester of pregnancy.

Supplemental Table 3. B-12 milk medians concentrations according to the maternal mental health status.

	B-12 milk concentrations			
	2-8 postpartum days (n=47) Median (IQR)	P[1]	28-50 postpartum days (n=70) Median (IQR)	P[1]
At 3rd trimester of pregnancy				
Depressive symptoms[2]		0.33		0.15
No	318.9 (223.4; 379.7)		266.5 (198.7; 412.4)	
Yes	231.9 (165.5; 464.7)		208.5 (169.2; 303.9)	
Anxiety state[3]		0.80		**0.04**
No	270.2 (156.2; 379.7)		199.2 (169.2; 253.4)	
Yes	251.0 (199.2; 406.8)		277.7 (191.7; 445.1)	
At 28 -50 postpartum days				
Depressive symptoms[2]		-		0.71
No	-		238.7(175.3; 349.7)	
Yes	-		271.2 (184.2; 329.2)	
Anxiety state[3]		-		0.98
No	-		239.4 (184.2; 335.7)	
Yes	-		239.0 (180.5; 345.1)	

Notes:
[1]Chi-square or Fisher's exact test
[2]Depressive symptoms were assessed by Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS).
[3]Anxiety state was assessed by the State-Trait Anxiety Inventory at 3rd trimester of pregnancy (STAI).



Supplemental Figure 1. Flow diagram of women with human milk samples and mental health information followed on Brazilian cohort.

Notes: Abbreviations: TP1= time point visit 1, TP2= time point visit 2.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese trouxe importantes contribuições para o campo do conhecimento da composição do LH ao gerar resultados inéditos e propor novas hipóteses para estudos futuros. Esta tese se destaca pelo desenho longitudinal do estudo e a inclusão de amostras nos estágios iniciais da lactação, o que possibilitou a análise das trajetórias das concentrações desses micronutrientes do LH e a investigação da relação entre alterações na saúde mental tanto na gestação quanto no pós-parto e as concentrações da vitamina B-12 no LH.

A partir do primeiro artigo, observou-se que participantes com concentrações mais altas de niacina, ácido pantotênico, B-12 e colina no início da lactação apresentaram menores concentrações dessas vitaminas ao longo da lactação quando comparadas às participantes que começaram com concentrações mais baixas. Adicionalmente, mudanças nas trajetórias das concentrações de B-12 no LH foram associadas ao IMC pré-gestacional materno e a ingestão de vitamina B-12 durante a gestação. A ingestão de niacina durante a lactação também foi associada às concentrações desta vitamina no LH, porém com um resultado diferente do esperado. Neste caso, cabe destacar que as concentrações totais de niacina no LH, nesta tese, foram representadas apenas por duas formas de niacina e não por todas as formas diferentes disponíveis no LH, portanto, a concentração total de niacina no LH não pode ser deduzida dos nossos resultados. Foram observadas maiores concentrações das frações hidrossolúveis da colina no LH, durante a lactação, em participantes com mais de 40 semanas gestacionais no parto quando comparadas às participantes com idade gestacional no parto entre 37-39 semanas. O uso de suplementos durante a gestação não foi associado às mudanças nas trajetórias das concentrações deste micronutrientes do LH.

A partir do segundo artigo, observou-se que o aumento nos escores de ansiedade-estado no final da gestação foi associado ao aumento das concentrações séricas de homocisteína e à diminuição das concentrações de B-12 no LH no primeiro mês pós-parto, mesmo após o ajuste para potenciais fatores de confusão. Não foram observadas associações entre sintomas depressivos e de ansiedade no terceiro trimestre da gestação e as concentrações séricas de B-12 no pós-parto. Observou-se também que o estado nutricional materno de vitamina B-12 (avaliado pelas

concentrações séricas de B-12 e homocisteína) foi correlacionado com as concentrações de B-12 do LH.

Os produtos desta tese contribuíram para a geração de novas hipóteses a serem testadas, principalmente, por estudos de maior tamanho amostral e ensaios clínicos. Dentre as novas hipóteses suscitadas pelo artigo 1, temos a necessidade de entender como os fatores maternos podem afetar indiretamente as trajetórias destas vitaminas do LH, incluindo a necessidade de realizar outras formas de análise para investigar, por exemplo, relações mediadas ou moderadas pelas concentrações destes nutrientes do LH nos primeiros dias de lactação e outros fatores materno-infantis durante a lactação. Paralelamente, o artigo 2 levantou a hipótese de que as concentrações maternas de homocisteína podem ser um possível mediador da relação entre a saúde mental materna e concentrações de B-12 no leite. Deste modo, novos estudos poderiam investigar a homocisteína como um marcador alternativo do estado nutricional de B-12 em mulheres com sintomas de ansiedade e sem deficiência de folato ou outras doenças crônicas.

Algumas lições foram aprendidas ao longo da condução deste estudo e podem servir de direcionamento para estudos futuros no Brasil no campo de LH. Primeiro, o acompanhamento e coleta de amostras nos primeiros dias de lactação, fora das maternidades, pode ser extremamente dificultoso. Neste estudo, tentamos conciliar a data da primeira entrevista do pós-parto com a data de realização do teste do pezinho na clínica escolhida. Segundo, a taxa de perdas de acompanhamento em estudos longitudinais com coleta de diferentes amostras biológicas costuma ser alta. Uma alternativa para tentar minimizar estas perdas envolve a criação do vínculo com as participantes do estudo, por meio de rodas de conversas e utilização de mídias sociais. Terceiro, a condução de estudos longitudinais e a análise de amostras biológicas costuma ser bastante dispendiosa, principalmente, considerando o atual cenário de baixo financiamento destinado à pesquisa no Brasil. Neste cenário, a realização de parcerias internacionais podem contribuir tanto no compartilhamento de sua expertise no tema como, em algumas situações, fornecer subsídios para condução do estudo ou a análise das amostras biológicas.

Os principais achados desta tese ratificam a importância da saúde materna para a composição do LH, especialmente para concentrações das vitaminas do complexo B e colina. Os presentes resultados apontam para a necessidade de monitorar a saúde mental, o consumo alimentar e indicadores antropométricos maternos nos serviços de saúde no período perinatal e anterior à

concepção a fim de prevenir hábitos comportamentais inadequados que podem resultar em estado nutricional materno deficiente destes nutrientes. A deficiência materna pode se propagar para a geração seguinte, ao impactar as reservas destes micronutrientes ao nascer e ao alterar a composição do LH. Crianças com baixas reservas ao nascer e que recebem baixas concentrações destes nutrientes provenientes do LH figuram em grupo de maior vulnerabilidade, especialmente nos primeiros meses de vida em que o LH constitui a única fonte de nutrição. Neste contexto, ainda existem lacunas sobre como modificações na composição do LH, principalmente a partir de fatores modificáveis maternos, podem afetar a saúde e desenvolvimento infantil, sendo, portanto, mais um caminho a ser trilhado por futuros estudos longitudinais.

REFERÊNCIAS

ALLEN, L. H Maternal micronutrient malnutrition: effects on breast milk and infant nutrition, and priorities for intervention. **SCN news**, n.11, p. 21-24, 1994a.

ALLEN, L. H. Vitamin B 12 metabolism and status during pregnancy, lactation and infancy. In: ALLEN L., KING J., LÖNNERDAL B. (org.). **Nutrient regulation during pregnancy, lactation, and infant growth**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Boston: Springer, 1994b, p. 173-186.

ALLEN, L. H. B vitamins in breast milk: relative importance of maternal status and intake, and effects on infant status and function. **Advances in nutrition**, v. 3, n. 3, p. 362-369, 2012.

ALLEN, L. H.; CARRIQUIRY, A. L.; MURPHY, S. P. Perspective: proposed harmonized nutrient reference values for populations. **Advances in Nutrition**, v. 11, n. 3, p. 469-483, 2020.

ALLEN, L. H.; DROR, D. K. Introduction to current knowledge on micronutrients in human milk: adequacy, analysis, and need for research. **Advances in Nutrition**, v. 9, n. suppl_1, p. 275S-277S, 2018.

ALLEN L. H., HAMPEL D. Human milk as the first source of micronutrients. In: MICHAELSEN K. F., NEUFELD L. M., PRENTICE A. M. (org.). **Global landscape of nutrition challenges in infants and children.** 93rd Nestlé Nutrition Institute Workshop, Kolkata, March 2019. Basel: Karger Publishers; 2020. p. 67–76

ALLEN, L. H.; HAMPEL, D. Water-soluble vitamins in human milk factors affecting their concentration and their physiological significance. In: DONOVAN, S. M.; GERMAN J. B.; LÖNNERDAL, B.; LUCAS, A. (org.). **Human Milk: Composition, Clinical Benefits and Future Opportunities**. New York: Karger Publishers, 2019, p. 69-81.

ALLEN, L. H. et al. Antiretroviral therapy provided to HIV-infected Malawian women in a randomized trial diminishes the positive effects of lipid-based nutrient supplements on breast-milk B vitamins. **The American journal of clinical nutrition**, 102, n. 6, p. 1468-1474, 2015.

ALLEN, L. H. et al. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND): vitamin B-12 review. **The Journal of nutrition**, v.148, n. suppl_4, p. 1995S-2027S, 2018.

ALTMAN, D. G.; BLAND, J. M. Interaction revisited: the difference between two estimates. **BMJ**, 326, n. 7382, p. 219, 2003.

ALVES-SANTOS, N. et al. Dietary intake variations from pre-conception to gestational period according to the degree of industrial processing: a Brazilian cohort. **Appetite**, v. 105, p. 164-171, 2016.

ANDERSON, O. S.; SANT, K. E.; DOLINOY, D. C. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 23, n. 8, p. 853-859, 2012.

ANDREAS, N. J.; KAMPMANN, B.; LE-DOARE, K. M. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early human development**, v. 91, n. 11, p. 629-635, 2015.

APARICIO, M. et al. Human milk cortisol and immune factors over the first three postnatal months: Relations to maternal psychosocial distress. **PloS one**, v. 15, n. 5, p. e0233554, 2020.

BAE, S. et al. Vitamin B-12 status differs among pregnant, lactating, and control women with equivalent nutrient intakes. **The Journal of nutrition**, v. 145, n. 7, p. 1507-1514, 2015.

BALA, R. et al. Hyperhomocysteinemia and low vitamin B12 are associated with the risk of early pregnancy loss: a clinical study and meta-analyses. **Nutrition Research**, v. 91, p. 57-66, 2021.

BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatric Clinics**, v. 60, n. 1, p. 49-74, 2013.

BARBIERI, P. et al. Validation of a food frequency questionnaire to assess food group intake by pregnant women. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 28, p. 38-44, 2015.

BARBIERI, P. et al. Relative validation of a quantitative FFQ for use in Brazilian pregnant women. **Public health nutrition**, v. 16, n. 8, p. 1419-1426, 2013.

BARKER, E. D. et al. Prenatal maternal depression symptoms and nutrition, and child cognitive function. **The British Journal of Psychiatry**, v. 203, n. 6, p. 417-421, 2013.

BASKIN, R. et al. The association between diet quality and mental health during the perinatal period. A systematic review. **Appetite**, v. 91, p. 41-47, 2015.

BASKIN, R. et al. Antenatal dietary patterns and depressive symptoms during pregnancy and early post-partum. **Maternal & child nutrition**, v. 13, n. 1, p. e12218, 2017.

BATALHA, M. A. et al. Factors associated with longitudinal changes in B-vitamin and choline concentrations of human milk. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 2021.

BATES, C. J. Thiamine. In: Zempleni, J., Rucker, R.B., McCormick, D.B., Suttie, J.W. (org.). **Handbook of Vitamins**. 4ª ed.; Boca Raton, FL: CRC Press, 2007. 593 p.

BEHERE, R. V. et al. Maternal vitamin B12 status during pregnancy and its association with outcomes of pregnancy and health of the offspring: a systematic review and implications for policy in India. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p. 619176, 2021.

BENSEÑOR, I. et al. Reproducibility and relative validity of the Food Frequency Questionnaire used in the ELSA-Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p. 379-389, 2013.

BENTON, D. Vitamins and neural and cognitive developmental outcomes in children. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 1, p. 14-26, 2012.

BIAGGIO, A.; NATALICIO, L. **Manual para o Inventario de Ansiedade Traço-Estado (IDATE)**. Rio De Janeiro: Centro de Psicologia Aplicada, 1979.

BIAGGIO, A. M. B.; NATALÍCIO, L.; SPIELBERGER, C. D. Desenvolvimento da forma experimental em português do Inventário de Ansiedade Traço-Estado (IDATE) de Spielberger. **Arquivos brasileiros de psicologia aplicada**, v. 29, n. 3, p. 31-44, 1977.

BINIA, A. et al. Human milk oligosaccharides, infant growth, and adiposity over the first 4 months of lactation. **Pediatric Research**, p. 1-10, 2021.

BLACK, M. M. Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. **Food and nutrition bulletin**, v. 29, n. 2_suppl1, p. S126-S131, 2008.

BLUNDEN, C. H. et al. Postpartum depressive symptoms: the B-vitamin link. **Mental health in family medicine**, v. 9, n. 1, p. 5, 2012.

BOCCOLINI, C. S. et al. Tendência de indicadores do aleitamento materno no Brasil em três décadas. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, 2017.

BODNAR, L. M.; WISNER, K. L. Nutrition and depression: implications for improving mental health among childbearing-aged women. **Biological psychiatry**, v. 58, n. 9, p. 679-685, 2005.

BOIX-AMORÓS, A. et al. Reviewing the evidence on breast milk composition and immunological outcomes. **Nutrition reviews**, v. 77, n. 8, p. 541-556, 2019.

BOTTIGLIERI, T. Folate, vitamin B12, and neuropsychiatric disorders. **Nutrition reviews**, v. 54, n. 12, p. 382-390, 1996.

BOTTIGLIERI, T. Folate, vitamin B12, and S-adenosylmethionine. **The Psychiatric Clinics of North America**, v. 36, n. 1, p. 1-13, 2013.

BOTTIGLIERI, T. Homocysteine and folate metabolism in depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 29, n. 7, p. 1103-1112, 2005.

BOUTTÉ, A. K. et al. Associations of maternal stress and/or depressive symptoms with diet quality during pregnancy: a narrative review. **Nutrition Reviews**, v. 79, n. 5, p. 495-517, 2021.

BOYLAN, L. M. et al. Vitamin B-6 content of breast milk and neonatal behavioral functioning. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 102, n. 10, p. 1433-1438, 2002.

BRASIL. **Decreto nº 6690, de 11 de dezembro de 2008.** Institui o Programa de Prorrogação da Licença à Gestante e à Adotante, estabelece os critérios de adesão ao Programa e dá outras providências. Diário Oficial da União 2008; 12 dez.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa, 2008. 156 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 171, de 04 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano.** Brasília: Diário Oficial da União; Poder Executivo 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Saúde da criança: Nutrição Infantil Aleitamento Materno e Alimentação Complementar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 112 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Primária à Saúde. Departamento de Promoção de Saúde. **Guia Alimentar para crianças brasileiras menores de 2 anos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 265 p.

BRASIL, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008–2009. Tabelas de Medidas Referidas para os Alimentos Consumidos no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE, 2011. 351 p.

BRAVI, F. et al. Impact of maternal nutrition on breast-milk composition: a systematic review. **The American journal of clinical nutrition**, 104, n. 3, p. 646-662, 2016.

BUTTE, N. F.; LOPEZ-ALARCON, M. G.; GARZA, C. **Nutrient adequacy of exclusive breastfeeding for the term infant during the first six months of life**. Genebra: World Health Organization, 2002. 47 p.

BUTTERWORTH, R. F. Maternal thiamine deficiency: still a problem in some world communities. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 6, p. 712–713, 2001.

BZIKOWSKA-JURA, A. et al. Maternal nutrition and body composition during breastfeeding: association with human milk composition. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1379, 2018.

CARMEL, R. Diagnosis and management of clinical and subclinical cobalamin deficiencies: why controversies persist in the age of sensitive metabolic testing. **Biochimie**, v. 95, n. 5, p. 1047-1055, 2013.

CASAVALE, K. O. et al. NIH workshop on human milk composition: summary and visions, **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.110, n. 3, 2019.

CASTELLOTE, C. et al. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. **The Journal of nutrition**, v. 141, n. 6, p. 1181-1187, 2011.

CHANG, N. et al. Macronutrient composition of human milk from Korean mothers of full-term infants born at 37-42 gestational weeks. **Nutrition research and practice**, v. 9, n. 4, p. 433-438, 2015.

CHANG, S. J.; KIRKSEY, A. Pyridoxine supplementation of lactating mothers: relation to maternal nutrition status and vitamin B-6 concentrations in milk. **The American journal of clinical nutrition**, v. 51, n. 5, p. 826-831, 1990.

CHATFIELD, M.; MANDER, A. The Skillings–Mack test (Friedman test when there are missing data). **The Stata Journal**, v. 9, n. 2, p. 299-305, 2009.

CHENGFENG, S. et al. Hyperhomocysteinemia is a result, rather than a cause, of depression under chronic stress. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e106625, 2014.

CHONG, M. F. et al. Relationships of maternal folate and vitamin B12 status during pregnancy with perinatal depression: The GUSTO study. **Journal of psychiatric research**, v. 55, p. 110-116, 2014.

CHOWDHURY, R. et al. Breastfeeding and maternal health outcomes: a systematic review and meta-analysis. **Acta paediatrica**, v. 104, p. 96-113, 2015.

CHRISTIAN, P. et al. The need to study human milk as a biological system. **The American journal of clinical nutrition**, v. 113, n. 5, p. 1063-1072, 2021.

CHRISTIAN, P.; STEWART, C. P. Maternal micronutrient deficiency, fetal development, and the risk of chronic disease. **The Journal of nutrition**, v. 140, n. 3, p. 437-445, 2010.

CLARE, C. E. et al. One-carbon metabolism: linking nutritional biochemistry to epigenetic programming of long-term development. **Annual review of animal biosciences**, v. 7, p. 263-287, 2019.

COO, S.; GARCÍA, M. I.; MIRA, A.; VALDÉS, V. The role of perinatal anxiety and depression in breastfeeding practices. **Breastfeeding Medicine**, v. 15, n. 8, p. 495-500, 2020.

CORTÉS-MACÍAS, E. et al. Breastfeeding Practices Influence the Breast Milk Microbiota Depending on Pre-Gestational Maternal BMI and Weight Gain over Pregnancy. **Nutrients**, v. 13, n. 5, p. 1518, 2021.

COX, J. L.; HOLDEN, J. M.; SAGOVSKY, R. Detection of postnatal depression: development of the 10-item Edinburgh Postnatal Depression Scale. **The British journal of psychiatry**, 150, n. 6, p. 782-786, 1987.

DADI, A. F.; MILLER, E. R.; MWANRI, L. Postnatal depression and its association with adverse infant health outcomes in low-and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. **BMC pregnancy and childbirth**, v. 20, n. 1, p. 1-15, 2020.

DAGNELIEL, P. et al. Nutrients and contaminants in human milk from mothers on macrobiotic and omnivorous diets. **European journal of clinical nutrition**, v. 46, p. 355-366, 1992.

DAKSHINAMURTI, S.; DAKSHINAMURTI, K. Vitamin B6. In: ZEMPLENI, J.; SUTTIE, J.W.; GREGORY, J.F.; STOVER, P.J. (org.). **Handbook of Vitamins**, 5 ed. Boca Raton, FL: CRC Press. 2013. 605 p.

DALTO, D. B.; MATTE, J. Pyridoxine (vitamin B6) and the glutathione peroxidase system; a link between one-carbon metabolism and antioxidation. **Nutrients**, v. 9, n. 3, p. 189, 2017.

DALY, S. E.; HARTMANN, P. E. Infant demand and milk supply. Part 1: Infant demand and milk production in lactating women. **Journal of Human Lactation**, 11, n. 1, p. 21-26, 1995.

DANIEL, A. I. et al. Maternal BMI is positively associated with human milk fat: a systematic review and meta-regression analysis. **The American journal of clinical nutrition**, v.113, n. 4, p. 1009-1022, 2021.

DANIELS, L. et al. Micronutrient intakes of lactating mothers and their association with breast milk concentrations and micronutrient adequacy of exclusively breastfed Indonesian infants. **The American journal of clinical nutrition**, 110, n. 2, p. 391-400, 2019.

DAVENPORT, C. et al. Choline intakes exceeding recommendations during human lactation improve breast milk choline content by increasing PEMT pathway metabolites. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 26, n. 9, p. 903-911, 2015.

DAVIS, J. C. et al. Growth and morbidity of Gambian infants are influenced by maternal milk oligosaccharides and infant gut microbiota. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2017.

DE VRIES, J. Y. et al. Maternal Circulating Vitamin Status and Colostrum Vitamin Composition in Healthy Lactating Women—A Systematic Approach. **Nutrients**, v. 10, n. 6, p. 687, 2018.

DEEGAN, K. L. et al. Breast milk vitamin B-12 concentrations in Guatemalan women are correlated with maternal but not infant vitamin B-12 status at 12 months postpartum. **The Journal of nutrition**, v. 142, n. 1, p. 112-116, 2012.

DENNIS, C.-L.; FALAH-HASSANI, K.; SHIRI, R. Prevalence of antenatal and postnatal anxiety: systematic review and meta-analysis. **The British Journal of Psychiatry**, v. 210, n. 5, p. 315-323, 2017.

DERBYSHIRE, E.; OBEID, R. Choline, neurological development and brain function: A systematic review focusing on the first 1000 days. **Nutrients**, 12, n. 6, p. 1731, 2020.

DHIMAN, P. et al. Cross-sectional association between vitamin B12 status and probable postpartum depression in Indian women. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 21, n. 1, p. 1-11, 2021.

DI BENEDETTO, M. G. et al. Nutritional and immunological factors in breast milk: A role in the intergenerational transmission from maternal psychopathology to child development. **Brain, behavior, and immunity**, v. 85, p. 57-68, 2020.

DIAS, C. C.; FIGUEIREDO, B. Breastfeeding and depression: a systematic review of the literature. **Journal of affective disorders**, v. 171, p. 142-154, 2015.

DIETERICH, C. M. et al. Breastfeeding and health outcomes for the mother-infant dyad. **Pediatric Clinics**, v. 60, n. 1, p. 31-48, 2013.

DOIS, A. et al. Factores de riesgo asociados a síntomas depresivos post parto en mujeres de bajo riesgo obstétrico atendidas en el sistema público. **Revista médica de Chile**, v. 140, n. 6, p. 719-725, 2012.

DONOHUE, J. A. et al. Micronutrient supplementation of lactating Guatemalan women acutely increases infants' intake of riboflavin, thiamin, pyridoxal, and cobalamin, but not niacin, in a randomized crossover trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.112, n. 3, p. 669-682, 2020.

DONOVAN, S. M. Human Milk Proteins: Composition and Physiological Significance. In: DONOVAN, S. M.; GERMAN J. B.; LÖNNERDAL, B.; LUCAS, A. (org.). **Human Milk: Composition, Clinical Benefits and Future Opportunities.** 90th Nestlé Nutrition Institute Workshop. Lausanne: Karger Publishers. 2019. 234 p.

DONOVAN, S. M.; GERMAN J. B.; LÖNNERDAL, B.; LUCAS, A. (org.). **Human Milk: Composition, Clinical Benefits and Future Opportunities.** 90th Nestlé Nutrition Institute Workshop. Lausanne: Karger Publishers. 2019. 234 p.

DOS SANTOS MORAES, A. O. et al. Sintomas de ansiedade gestacional e pós-parto e intenção de amamentar exclusivo até os seis meses: resultados de uma coorte prospectiva do Rio de Janeiro. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 16, p. 51297, 2021.

DROR, D. K.; ALLEN, L. H. Overview of nutrients in human milk. **Advances in nutrition**, v. 9, n. suppl_1, p. 278S-294S, 2018.

DUGGAN, C. et al. Vitamin B-12 supplementation during pregnancy and early lactation increases maternal, breast milk, and infant measures of vitamin B-12 status. **The Journal of nutrition**, 144, n. 5, p. 758-764, 2014.

ERICK, M. Breast milk is conditionally perfect. **Medical hypotheses**, v. 111, p. 82-89, 2018.

ERIKSEN, K. G. et al. Human milk composition and infant growth. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 21, n. 3, p. 200-206, 2018.

FALLON, V. et al. Postpartum anxiety and infant-feeding outcomes: a systematic review. **Journal of Human Lactation**, v. 32, n. 4, p. 740-758, 2016.

FARIAS, D. R. et al. Maternal mental health and gestational weight gain in a Brazilian Cohort. **Scientific reports**, 11, n. 1, p. 1-11, 2021.

FARÍAS-ANTÚNEZ, S. et al. Maternal mood symptoms in pregnancy and postpartum depression: association with exclusive breastfeeding in a population-based birth cohort. **Social psychiatry and psychiatric epidemiology**, v. 55, n. 5, p. 635-643, 2020.

FERREIRA, A. L. et al. Human milk oligosaccharide profile variation throughout postpartum in healthy women in a Brazilian cohort. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 790, 2020.

FIGUEIREDO, B.; CONDE, A. Anxiety and depression in women and men from early pregnancy to 3-months postpartum. **Archives of women's mental health**, v. 14, n. 3, p. 247-255, 2011.

FINKELSTEIN, J. L.; LAYDEN, A. J.; STOVER, P. J. Vitamin B-12 and perinatal health. **Advances in Nutrition**, v. 6, n. 5, p. 552-563, 2015.

FIRTH, J. et al. Food and mood: how do diet and nutrition affect mental wellbeing? **BMJ**, v. 369, p. m2382, 2020.

FISCHER, L. M. et al. Choline intake and genetic polymorphisms influence choline metabolite concentrations in human breast milk and plasma. **The American journal of clinical nutrition**, v. 92, n. 2, p. 336-346, 2010.

FOLSTEIN, M. et al. The homocysteine hypothesis of depression. **American Journal of Psychiatry**, v. 164, n. 6, p. 861-867, 2007.

FRANKENBURG, F. R. The role of one-carbon metabolism in schizophrenia and depression. **Harvard review of psychiatry**, v. 15, n. 4, p. 146-160, 2007.

GALBALLY, M. et al. Maternal diet, depression and antidepressant treatment in pregnancy and across the first 12 months postpartum in the MPEWS pregnancy cohort study: Perinatal diet, depression and antidepressant use. **Journal of Affective Disorders**, v. 288, p. 74-82, 2021.

GAO, X. et al. Higher dietary choline and betaine intakes are associated with better body composition in the adult population of Newfoundland, Canada. **PloS one**, 11, n. 5, p. e0155403, 2016.

GARCÍA, O. P.; LONG, K. Z.; ROSADO, J. L. Impact of micronutrient deficiencies on obesity. **Nutrition reviews**, v. 67, n. 10, p. 559-572, 2009.

GELAYE, B. et al. Epidemiology of maternal depression, risk factors, and child outcomes in low-income and middle-income countries. **The Lancet Psychiatry**, v. 3, n. 10, p. 973-982, 2016.

GERNAND, A. D. et al. Micronutrient deficiencies in pregnancy worldwide: health effects and prevention. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 5, p. 274-289, 2016.

GIBSON, R. S. et al. Association of maternal diet, micronutrient status, and milk volume with milk micronutrient concentrations in Indonesian mothers at 2 and 5 months postpartum. **The American journal of clinical nutrition**, v. 112, n. 4, p. 1039-1050, 2020.

GLIER, M. B.; GREEN, T. J.; DEVLIN, A. M. Methyl nutrients, DNA methylation, and cardiovascular disease. **Molecular nutrition & food research**, 58, n. 1, p. 172-182, 2014.

GREEN, R. et al. Vitamin B12 deficiency. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1-20, 2017.

GREEN, R.; MILLER, J. W. Vitamin B_{12}. In: ZEMPLENI, J., RUCKER, R.B., MCCORMICK, D.B., SUTTIE, J.W. **Handbook of Vitamins**. 4 ed. (org.). Boca Raton, FL: CRC Press. 2007. 593 p.

GREEN, R.; MILLER, J. W. Vitamin B12 deficiency is the dominant nutritional cause of hyperhomocysteinemia in a folic acid-fortified population. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 43, n. 10, p. 1048-1051, 2005.

GREIBE, E. et al. Cobalamin and haptocorrin in human milk and cobalamin-related variables in mother and child: a 9-mo longitudinal study. **The American journal of clinical nutrition**, 98, n. 2, p. 389-395, 2013.

GUNDERSON, E. P. et al. Lactation duration and midlife atherosclerosis. **Obstetrics and gynecology**, v. 126, n. 2, p. 381, 2015.

HAHN-HOLBROOK, J.; CORNWELL-HINRICHS, T.; ANAYA, I. Economic and health predictors of national postpartum depression prevalence: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of 291 studies from 56 countries. **Frontiers in psychiatry**, v. 8, p. 248, 2018.

HAMPEL, D. et al. Thiamin and riboflavin in human milk: effects of lipid-based nutrient supplementation and stage of lactation on vitamer secretion and contributions to total vitamin content. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0149479, 2016.

HAMPEL, D. et al. Competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for vitamin B12 analysis in human milk. **Food chemistry**, v. 153, p. 60-65, 2014.

HAMPEL, D. et al. Vitamin concentrations in human milk vary with time within feed, circadian rhythm, and single-dose supplementation. **The Journal of nutrition**, v. 147, n. 4, p. 603-611, 2017.

HAMPEL, D. et al. High-throughput analysis of water-soluble forms of choline and related metabolites in human milk by UPLC-MS/MS and its application. **Frontiers in nutrition**, v. 7, 2020.

HAMPEL, D.; YORK, E. R.; ALLEN, L. H. Ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry (UPLC–MS/MS) for the rapid, simultaneous analysis of thiamin, riboflavin,

flavin adenine dinucleotide, nicotinamide and pyridoxal in human milk. **Journal of Chromatography B**, v. 903, p. 7-13, 2012.

HANDLIN, L. et al. Effects of sucking and skin-to-skin contact on maternal ACTH and cortisol levels during the second day postpartum—influence of epidural analgesia and oxytocin in the perinatal period. **Breastfeeding medicine**, 4, n. 4, p. 207-220, 2009.

HANSEN, K. Breastfeeding: a smart investment in people and in economies. **The Lancet**, v. 387, n. 10017, p. 416, 2016.

HENJUM, S. et al. Vitamin B12 concentrations in milk from Norwegian women during the six first months of lactation. **European journal of clinical nutrition**, v. 74, n. 5, p. 749-756, 2020.

HEWITT, C. E. et al. Instruments to identify post-natal depression: which methods have been the most extensively validated, in what setting and in which language? **International journal of psychiatry in clinical practice**, v.14, n. 1, p. 72-76, 2010.

HORTA, B. L.; LORET DE MOLA, C.; VICTORA, C. G. Breastfeeding and intelligence: a systematic review and meta-analysis. **Acta paediatrica**, v. 104, p. 14-19, 2015a.

HORTA, B. L.; LORET DE MOLA, C.; VICTORA, C. G. Long-term consequences of breastfeeding on cholesterol, obesity, systolic blood pressure and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Acta paediatrica**, 104, p. 30-37, 2015b.

HOWARD, L. M.; KHALIFEH, H. Perinatal mental health: a review of progress and challenges. **World Psychiatry**, v. 19, n. 3, p. 313-327, 2020.

HOWARD, L. M. et al. Non-psychotic mental disorders in the perinatal period. **The Lancet**, v. 384, n. 9956, p. 1775-1788, 2014.

HURE, A. J.; COLLINS, C. E.; SMITH, R. A longitudinal study of maternal folate and vitamin B12 status in pregnancy and postpartum, with the same infant markers at 6 months of age. **Maternal and child health journal**, v. 16, n. 4, p. 792-801, 2012.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline.** Washington: National Academies Press, 1998. 432 p.

JENNESS, R., The composition of human milk. **Seminars in perinatology**, v. 3, n. 3, p. 225-239, 1979.

KAC, G. et al. Breastfeeding and postpartum weight retention in a cohort of Brazilian women. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 3, p. 487-493, 2004.

KADER, M. A. et al. Lactation patterns in Egyptian women II. Chemical composition of milk during the first year of lactation. **Journal of biosocial science**, v. 4, n. 4, p. 403-409, 1972.

KALHAN, S. C. One carbon metabolism in pregnancy: Impact on maternal, fetal and neonatal health. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 435, p. 48-60, 2016.

KEIM, S. A. et al. Depressive symptoms during pregnancy and the concentration of fatty acids in breast milk. **Journal of Human Lactation**, v. 28, n. 2, p. 189-195, 2012.

KENNEDY, D. O. B vitamins and the brain: mechanisms, dose and efficacy—a review. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 68, 2016.

KENT, J. C. et al. Volume and frequency of breastfeedings and fat content of breast milk throughout the day. **Pediatrics**, v. 117, n. 3, p. e387-e395, 2006.

KINGSTON, D.; TOUGH, S. Prenatal and postnatal maternal mental health and school-age child development: a systematic review. **Maternal and child health journal**, v. 18, n. 7, p. 1728-1741, 2014.

KIRKLAND, J.B. Niacin. In: ZEMPLENI, J.; SUTTIE, J.W.; GREGORY, J.F.; STOVER, P.J. (org.). **Handbook of Vitamins**, 5 ed. Boca Raton, FL: CRC Press. 2013. 605 p.

KHAN, R. et al. Association of Maternal depression with diet: A systematic review. **Asian journal of psychiatry**, v. 52, p. 102098, 2020.

KODENTSOVA, V.; VRZHESINSKAYA, O. Evaluation of the vitamin status in nursing women by vitamin content in breast milk. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 141, n. 3, p. 323-327, 2006.

KORSMO, H. W.; JIANG, X. One carbon metabolism and early development: a diet-dependent destiny. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 32, n. 8, p.579-593, 2021.

KORTESNIEMI, M. et al. Human milk metabolome is associated with symptoms of maternal psychological distress and milk cortisol. **Food Chemistry**, v. 356, p. 129628, 2021.

KRAMER, M. S.; KAKUMA, R. Optimal duration of exclusive breastfeeding. **Cochrane database of systematic reviews**, n. 8, 2012.

KUGANANTHAN, S. et al. Associations between maternal body composition and appetite hormones and macronutrients in human milk. **Nutrients**, v. 9, n. 3, p. 252, 2017.

KULSKI, J.; HARTMANN, P. Changes in human milk composition during the initiation of lactation. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 59, n. 1, p. 101-114, 1981.

LEE, A. M. et al. Prevalence, course, and risk factors for antenatal anxiety and depression. **Obstetrics & Gynecology**, v. 110, n. 5, p. 1102-1112, 2007.

LEGHI, G. E. et al. The impact of maternal obesity on human milk macronutrient composition: A systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 934, 2020.

LEVIS, B. et al. Accuracy of the Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS) for screening to detect major depression among pregnant and postpartum women: systematic review and meta-analysis of individual participant data. **BMJ**, v. 371, 2020.

LEYSE-WALLACE R. **Nutrition and mental health.** 1ºed. Boca Raton: CRC press, 2013. 308 p.

LOHMAN, T. G. et al. **Anthropometric standardization reference manual**. Champaign, IL: Human Kinetics Books, 1988. 177 p.

LÖNNERDAL, B. Effects of maternal dietary intake on human milk composition. **The Journal of nutrition**, v. 116, n. 4, p. 499-513, 1986.

LOTTO, V.; CHOI, S.-W.; FRISO, S. Vitamin B6: a challenging link between nutrition and inflammation in CVD. **British Journal of Nutrition**, 106, n. 2, p. 183-195, 2011.

LUKOSE, A. et al. Nutritional factors associated with antenatal depressive symptoms in the early stage of pregnancy among urban South Indian women. **Maternal and child health journal**, v. 18, n. 1, p. 161-170, 2014.

LWENO, O. N. et al. Vitamin B12 is low in milk of early postpartum women in urban Tanzania, and was not significantly increased by high dose supplementation. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 963, 2020.

MAGNÚSDÓTTIR, S. et al. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes. **Frontiers in genetics**, v. 6, p. 148, 2015.

MAHDAVIFAR, B. et al. Dietary intake of B vitamins and their association with depression, anxiety, and stress symptoms: A cross-sectional, population-based survey. **Journal of Affective Disorders**, v. 288, p. 92-98, 2021.

MAIA, P. R. d. S. et al. Rede Nacional de Bancos de Leite Humano: gênese e evolução. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 6, p. 285-292, 2006.

MÄKELÄ, J. et al. Breast milk fatty acid composition differs between overweight and normal weight women: the STEPS Study. **European journal of nutrition**, v. 52, n. 2, p. 727-735, 2013.

MARX, W. et al. Nutritional psychiatry: the present state of the evidence. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 76, n. 4, p. 427-436, 2017.

MAZZOCCHI, A. et al. Hormones in breast milk and effect on infants' growth: A systematic review. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1845, 2019.

MCMANUS, R. M. et al. Beta-cell function and visceral fat in lactating women with a history of gestational diabetes. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 50, n. 6, p. 715-719, 2001.

MCNULTY, H. et al. Addressing optimal folate and related B-vitamin status through the lifecycle: health impacts and challenges. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 78, n. 3, p. 449-462, 2019.

MENSINK, G. et al. Mapping low intake of micronutrients across Europe. **British journal of nutrition**, v. 110, n. 4, p. 755-773, 2013.

MEYER-FICCA, M.; KIRKLAND, J. B. Niacin. **Advances in Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 556-558, 2016.

MIKKELSEN, K.; STOJANOVSKA, L.; APOSTOLOPOULOS, V. The effects of vitamin B in depression. **Current medicinal chemistry**, v. 23, n. 38, p. 4317-4337, 2016.

MIMOUNI-BLOCH, A. et al. Thiamine deficiency in infancy: long-term follow-up. **Pediatric neurology**, v. 51, n. 3, p. 311-316, 2014.

MISCHOULON, D.; FAVA, M. Role of S-adenosyl-L-methionine in the treatment of depression: a review of the evidence. **The American journal of clinical nutrition**, v. 76, n. 5, p. 1158S-1161S, 2002.

MITOULAS, L. R. et al. Variation in fat, lactose and protein in human milk over 24h and throughout the first year of lactation. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 1, p. 29-37, 2002.

MOLINA, M. D. C. B. et al. Reproducibility and Relative Validity of the Food Frequency Questionnaire Used in the ELSA-Brasil. **Cadernos de saude publica**, 29, n. 2, p. 379-389, 2013.

MOLLOY, A. M. et al. Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development. **Food and nutrition bulletin**, v. 29, n. 2_suppl1, p. S101-S111, 2008.

MONTEIRO, F. R. et al. Influence of Maternity Leave on Exclusive Breastfeeding: Analysis from Two Surveys Conducted in the Federal District of Brazil. **Journal of Human Lactation**, v. 35, n. 2, p. 362-370, 2019.

MORADI, F. et al. The association between serum homocysteine and depression: A systematic review and meta-analysis of observational studies. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 51, n. 5, p. e13486, 2021.

MORETTI, R. et al. Homocysteine in neurology: from endothelium to neurodegeneration. **Current Nutrition & Food Science**, v. 13, n. 3, p. 163-175, 2017.

MURPHY, M. M. et al. Longitudinal study of the effect of pregnancy on maternal and fetal cobalamin status in healthy women and their offspring. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 8, p. 1863-1867, 2007.

MURRAY, D.; COX, J. L. Screening for depression during pregnancy with the Edinburgh Depression Scale (EDDS). **Journal of reproductive and infant psychology**, v. 8, n. 2, p. 99-107, 1990.

NEELON, S. E. B. et al. Correlation between maternal and infant cortisol varies by breastfeeding status. **Infant Behavior and Development**, v. 40, p. 252-258, 2015.

NEPA–UNICAMP. **TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4 ed. São Paulo: Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação, 2011.

NEUMANN, C. G. et al. Low vitamin B12 intake during pregnancy and lactation and low breastmilk vitamin B12 content in rural Kenyan women consuming predominantly maize diets. **Food and nutrition bulletin**, 34, n. 2, p. 151-159, 2013.

NEVES, P. A. et al. Rates and time trends in the consumption of breastmilk, formula, and animal milk by children younger than 2 years from 2000 to 2019: analysis of 113 countries. **The Lancet Child & Adolescent Health**, 2021. No prelo.

O'CONNOR, E. et al. Primary care screening for and treatment of depression in pregnant and postpartum women: evidence report and systematic review for the US Preventive Services Task Force. **JAMA**, v. 315, n. 4, p. 388-406, 2016.

OKADA, M. et al. Transforming growth factor (TGF)-α in human milk. **Life sciences**, v. 48, n. 12, p. 1151-1156, 1991.

ORTEGA, R. M. et al. Thiamin status during the third trimester of pregnancy and its influence on thiamin concentrations in transition and mature breast milk. **British journal of nutrition**, v. 92, n. 1, p. 129-135, 2004.

OVERHOLSER, B. R.; SOWINSKI, K. M. Biostatistics primer: part 2. **Nutrition in Clinical Practice**, 23, n. 1, p. 76-84, 2008.

PAGOTO, S. L. et al. Association of depressive symptoms and lifestyle behaviors among Latinos at risk of type 2 diabetes. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, n. 7, p. 1246-1250, 2009.

PANG, W. W.; HARTMANN, P. E. Initiation of human lactation: secretory differentiation and secretory activation. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 12, n. 4, p. 211-221, 2007.

PARSONS, C. E. et al. Postnatal depression and its effects on child development: a review of evidence from low-and middle-income countries. **British medical bulletin**, v. 101, n. 1, p. 57-79, 2012.

PATRINI, C.; GRIZIOTTI, A.; RICCIARDI, L. Obese individuals as thiamin storers. **International journal of obesity**, v. 28, n. 7, p. 920-924, 2004.

PATTERSON, K. Y. et al. USDA database for the choline content of common foods, release two. NDL Home Page. Disponível em: http://www.ars.usda.gov/nutrientdata 2008. Acesso em: 22 nov. 2019

PAWLAK, R. et al. Vitamin B-12 content in breast milk of vegan, vegetarian, and nonvegetarian lactating women in the United States. **The American journal of clinical nutrition**, v. 108, n. 3, p. 525-531, 2018.

PEARSON, R. M. et al. Maternal depression during pregnancy and the postnatal period: risks and possible mechanisms for offspring depression at age 18 years. **JAMA psychiatry**, v. 70, n. 12, p. 1312-1319, 2013.

PEPPARD, L. et al. Risk of depression in pregnant women with low-normal serum vitamin B12. **Research in nursing & health**, v. 42, n. 4, p. 264-272, 2019.

PÉREZ-ESCAMILLA, R. et al. Perspective: should exclusive breastfeeding still be recommended for 6 months? **Advances in Nutrition**, v. 10, n. 6, p. 931-943, 2019.

PÉREZ-ESCAMILLA, R.; MARTINEZ, J. L.; SEGURA-PÉREZ, S. Impact of the Baby-friendly Hospital Initiative on breastfeeding and child health outcomes: a systematic review. **Maternal & child nutrition**, v. 12, n. 3, p. 402-417, 2016.

PERRIN, M. T. et al. Total water-soluble choline concentration does not differ in milk from vegan, vegetarian, and nonvegetarian lactating women. **The Journal of nutrition**, v. 150, n. 3, p. 512-517, 2019.

PICCIANO, M. F. Nutrient composition of human milk. **Pediatric Clinics of North America**, v. 48, n. 1, p. 53-67, 2001.

PRATT, J. et al. Metabolism of Women during the Reproductive Cycle: XVIII. The Effect of Multi-Vitamin Supplements on the Secretion of B Vitamins in Human Milk, One Figure. **The Journal of nutrition**, v. 44, n. 1, p. 141-157, 1951.

PRENTICE, A. Constituents of human milk. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 17, n. 4, p. 1-10, 1996.

PRENTICE, A. et al. Dietary supplementation of lactating Gambian women. I. Effect on breast-milk volume and quality. **Human nutrition. Clinical nutrition**, v. 37, n. 1, p. 53-64, 1983.

PRENTICE, P. et al. Breast milk nutrient content and infancy growth. **Acta Paediatrica**, v. 105, n. 6, p. 641-647, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates.** Geneva: World Health Organization; 2017

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Indicators for assessing infant and young**

child feeding practices: part 1: definitions: conclusions of a consensus meeting held 6–8 November 2007 in Washington, DC, USA. Geneva: World Health Organization; 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Maternal anthropometry and pregnancy outcomes. A WHO Collaborative Study: Introduction. **Bulletin World Health Organization,** v. 73 Suppl, p. 1-6, 1995.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **National Implementation of the Baby-friendly Hospital Initiative**, 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. [acesso em 10 de outubro 2019]. Disponível em: http://www.who.int/nutrition/publications/infantfeeding/bfhi-national-implementation2017/en/

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Promoting mental health: concepts, emerging evidence, practice: a report of the World Health Organization, Department of Mental Health and Substance Abuse in collaboration with the Victorian Health Promotion Foundation and the University of Melbourne**. Geneva: World Health Organization; 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Report of the expert consultation of the optimal duration of exclusive breastfeeding, Geneva, Switzerland, 28-30 March 2001**. Geneva: World Health Organization. 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE/FUNDO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A INFÂNCIA (OMS/UNICEF). **Indicators for assessing infant and young child feeding practices: definitions and measurement methods**. Geneva: World Health Organization and the United Nations Children's Fund (WHO/UNICEF), 2021

RALLIS, S. et al. The transition to motherhood: towards a broader understanding of perinatal distress. **Women and Birth**, v. 27, n. 1, p. 68-71, 2014.

RASMUSSEN, K. M. At long last: new information on the association between maternal dietary intake, the composition of human milk, and its nutrient adequacy for infants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 110, n. 2, p. 269–270, 2019.

RECHENBERG, K.; HUMPHRIES, D. Nutritional interventions in depression and perinatal depression. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 86, n. 2, p. 127, 2013.

REES, S.; CHANNON, S.; WATERS, C. S. The impact of maternal prenatal and postnatal anxiety on children's emotional problems: a systematic review. **European child & adolescent psychiatry**, v. 28, n. 2, p. 257-280, 2019.

REN, X. et al. B-vitamin levels in human milk among different lactation stages and areas in China. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0133285, 2015.

REYNOLDS, E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. **The lancet neurology**, v. 5, n. 11, p. 949-960, 2006.

RIVLIN, R. S. Riboflavin (vitamin B_2). In: ZEMPLENI, J., RUCKER, R.B., MCCORMICK, D.B., SUTTIE, J.W. **Handbook of Vitamins**. 4 ed. (org.). Boca Raton, FL: CRC Press. 2007. 593 p.

ROGNE, T. et al. Maternal vitamin B12 in pregnancy and risk of preterm birth and low birth weight: A systematic review and individual participant data meta-analysis. **American journal of epidemiology**, v. 185, n. 3, p. 212, 2017.

RUCKER, R.B.; BAUERLY, K. Pantothenic acid. In: ZEMPLENI, J.; SUTTIE, J.W.; GREGORY, J.F.; STOVER, P.J. (org.). **Handbook of Vitamins**, 5 ed. Boca Raton, FL: CRC Press. 2013. 605 p.

RUSH, E.; KATRE, P.; YAJNIK, C. Vitamin B12: one carbon metabolism, fetal growth and programming for chronic disease. **European journal of clinical nutrition**, 68, n. 1, p. 2-7, 2014.

SADR DADRES, G. et al. Relationship of maternal weight status before, during, and after pregnancy with breast milk hormone concentrations. **Obesity**, v. 27, n. 4, p. 621-628, 2019.

SAEED, A. et al. Effect of antenatal depression on maternal dietary intake and neonatal outcome: a prospective cohort. **Nutrition journal**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2015.

SAITO, S. et al. Transforming growth factor-beta (TGF-β) in human milk. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 94, n. 1, p. 220-224, 1993.

SÁNCHEZ-VILLEGAS, A. et al. Association between folate, vitamin B6 and vitamin B12 intake and depression in the SUN cohort study. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 22, n. 2, p. 122-133, 2009.

SANTOS, I. S. et al. Validation of the Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS) in a sample of mothers from the 2004 Pelotas Birth Cohort Study. **Cadernos de saude publica**, v. 23, n. 11, p. 2577-2588, 2007.

SECHI, G. et al. Advances in clinical determinants and neurological manifestations of B vitamin deficiency in adults. **Nutrition reviews**, v. 74, n. 5, p. 281-300, 2016.

SELHUB, J. Homocysteine metabolism. **Annual review of nutrition**, v. 19, n. 1, p. 217-246, 1999.

SELHUB, J. Public health significance of elevated homocysteine. **Food and nutrition bulletin**, v. 29, n. 2_suppl1, p. S116-S125, 2008.

SIMS, C. R. et al. Human milk composition differs by maternal BMI in the first 9 months postpartum. **The American journal of clinical nutrition**, v. 112, n. 3, p. 548-557, 2020.

SINCLAIR, K. D. et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 49, p. 19351-19356, 2007.

SINHA, B. et al. Interventions to improve breastfeeding outcomes: A systematic review and meta-analysis. **Acta paediatrica**, v. 104, p. 114-134, 2015.

SMITHERS, L. G.; KRAMER, M. S.; LYNCH, J. W. Effects of breastfeeding on obesity and intelligence: causal insights from different study designs. **JAMA pediatrics**, v. 169, n. 8, p. 707-708, 2015.

SONG, W. et al. Effect of pantothenic acid status on the content of the vitamin in human milk. **The American journal of clinical nutrition**, v. 40, n. 2, p. 317-324, 1984.

SPARLING, T. M. et al. Nutrients and perinatal depression: a systematic review. **Journal of nutritional science**, v.6, 2017.

SPECKER, B. L. et al. Vitamin B-12: low milk concentrations are related to low serum concentrations in vegetarian women and to methylmalonic aciduria in their infants. **The American journal of clinical nutrition**, v. 52, n. 6, p. 1073-1076, 1990.

SPIELBERGER, C. D. et al. **State-trait anxiety inventory.** Palo Alto, CA: Mind Garden, 1983.

SPRENGER, N.; BINIA, A.; AUSTIN, S. Human milk oligosaccharides: factors affecting their composition and their physiological significance. In: DONOVAN, S. M.; GERMAN J. B.; LÖNNERDAL, B.; LUCAS, A. (org.). **Human Milk: Composition, Clinical Benefits and Future Opportunities**. New York: Karger Publishers, 2019, p. 43-56.

STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. et al. The periconceptional period, reproduction and long-term health of offspring: the importance of one-carbon metabolism. **Human reproduction update**, v. 19, n. 6, p. 640-655, 2013.

STEIN, A. et al. Effects of perinatal mental disorders on the fetus and child. **The Lancet**, v. 384, n. 9956, p. 1800-1819, 2014.

SURENDRAN, S. et al. Evidence for the association between FTO gene variants and vitamin B12 concentrations in an Asian Indian population. **Genes & nutrition**, 14, n. 1, p. 1-9, 2019.

SUNDAY, E. M.; OKOLI, P. C.; DINWOKE, V. O. Level of awareness and treatment of anxiety and depression during pregnancy in southeast Nigeria. **South African Journal of Psychiatry**, 24, 2018.

TENDAIS, I. et al. Screening for depression and anxiety disorders from pregnancy to postpartum with the EPDS and STAI. **The Spanish journal of psychology**, v. 17, 2014.

TIAN, H.-M. et al. Dietary patterns affect maternal macronutrient intake levels and the fatty acid profile of breast milk in lactating Chinese mothers. **Nutrition**, v. 58, p. 83-88, 2019.

TIEMEIER, H. et al. Vitamin B12, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam Study. **American Journal of Psychiatry**, v. 159, n. 12, p. 2099-2101, 2002.

TRUJILLO, J. et al. A systematic review of the associations between maternal nutritional biomarkers and depression and/or anxiety during pregnancy and postpartum. **Journal of affective disorders**, v. 232, p. 185-203, 2018.

ULVIK, A. et al. Evidence for increased catabolism of vitamin B-6 during systemic inflammation. **The American journal of clinical nutrition**, 100, n. 1, p. 250-255, 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (UFRJ). **Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil – ENANI-2019: Resultados preliminares – Indicadores de aleitamento materno no Brasil.** Rio de Janeiro: UFRJ, 2020. 9 p.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28**. Bestiville: USDA, 2016. Disponível em: https://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964. Acesso em: 02 nov. 2020

VARSI, K. et al. Maternal serum cobalamin at 18 weeks of pregnancy predicts infant cobalamin status at 6 months—A prospective, observational study. **The Journal of nutrition**, 148, n. 5, p. 738-745, 2018.

VAZ, J. D. S. et al. Dietary patterns, n-3 fatty acids intake from seafood and high levels of anxiety symptoms during pregnancy: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e67671, 2013.

VAZ, J. D. S. et al. Omega-3 Supplementation from pregnancy to postpartum to prevent depressive symptoms: A Randomized Placebo-Controlled Trial. **BMC pregnancy and childbirth**, v. 17, n. 1, p. 180, 2017.

VAZ, J. D. S. et al. Monitoring breastfeeding indicators in high-income countries: levels, trends and challenges. **Maternal Child Nutrition**, v. 17, n. 3, e13137, 2021.

VAZ-PINTO, A. et al. Folic acid and vitamin B12 determination in fetal liver. **The American journal of clinical nutrition**, v. 28, n. 10, p. 1085-1086, 1975.

VENKATRAMANAN, S. et al. Vitamin B-12 and cognition in children. **Advances in nutrition**, v. 7, n. 5, p. 879-888, 2016.

VERLY-MIGUEL, M. V. B. et al. Serum docosahexaenoic acid (DHA) is inversely associated with anxiety disorders in early pregnancy. **Journal of anxiety disorders**, v. 30, p. 34-40, 2015.

VICTORA, C. G. et al. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. **The Lancet**, v. 387, n. 10017, p. 475-490, 2016.

VILELA, A. A. F. et al. Association of prepregnancy dietary patterns and anxiety symptoms from midpregnancy to early postpartum in a prospective cohort of Brazilian women. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 115, n. 10, p. 1626-1635, 2015.

VILELA, A. A. F. et al. Prepregnancy healthy dietary pattern is inversely associated with depressive symptoms among pregnant Brazilian women. **The Journal of nutrition**, v. 144, n. 10, p. 1612-1618, 2014.

VISENTIN, C. E. et al. Low serum vitamin B-12 concentrations are prevalent in a cohort of pregnant Canadian women. **The Journal of nutrition**, v. 146, n. 5, p. 1035-1042, 2016.

WALKER, A. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. **The Journal of pediatrics**, v. 156, n. 2, p. S3-S7, 2010.

WALTERS, D. D.; PHAN, L. T.; MATHISEN, R. The cost of not breastfeeding: global results from a new tool. **Health policy and planning**, v. 34, n. 6, p. 407-417, 2019.

WATANABE, H. et al. No relation between folate and homocysteine levels and depression in early pregnant women. **Bioscience trends**, v. 4, n. 6, 2010.

WEST, K. D.; KIRKSEY, A. Influence of vitamin B6 intake on the content of the vitamin in human milk. **The American journal of clinical nutrition**, v. 29, n. 9, p. 961-969, 1976.

WHITAKER, K. M. et al. Associations of maternal weight status before, during, and after pregnancy with inflammatory markers in breast milk. **Obesity**, v. 25, n. 12, p. 2092-2099, 2017.

WHITFIELD, K. C. et al. Perinatal consumption of thiamine-fortified fish sauce in rural Cambodia: a randomized clinical trial. **JAMA pediatrics**, v. 170, n. 10, p. e162065-e162065, 2016.

WIEDEMAN, A. M. et al. Concentrations of water-soluble forms of choline in human milk from lactating women in Canada and Cambodia. **Nutrients**, v. 10, n. 3, p. 381, 2018.

WILLETT, W. C.; HOWE, G. R.; KUSHI, L. H. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. **The American journal of clinical nutrition**, v. 65, n. 4, p. 1220S-1228S, 1997.

WILLIAMS, A. M. et al. Vitamin B-12 concentrations in breast milk are low and are not associated with reported household hunger, recent animal-source food, or vitamin B-12 intake in women in rural Kenya. **The Journal of nutrition**, v. 146, n. 5, p. 1125-1131, 2016.

WILLIAMS, A. M. et al. Infant serum and maternal milk vitamin b-12 are positively correlated in Kenyan infant-mother dyads at 1–6 months postpartum, irrespective of infant feeding practice. **The Journal of nutrition**, 148, n. 1, p. 86-93, 2018.

WISNER, K. L. et al. Onset timing, thoughts of self-harm, and diagnoses in postpartum women with screen-positive depression findings. **JAMA psychiatry**, v. 70, n. 5, p. 490-498, 2013.

WOODS, S. M. et al. Psychosocial stress during pregnancy. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 202, n. 1, p. 61. e61-61. e67, 2010.

WOODY, C. et al. A systematic review and meta-regression of the prevalence and incidence of perinatal depression. **Journal of affective disorders**, v. 219, p. 86-92, 2017.

WU, X. et al. Human milk nutrient composition in the United States: current knowledge, challenges, and research needs. **Current developments in nutrition**, v. 2, n. 7, p. nzy025, 2018.

WU, Y. et al. Associations of dietary vitamin B1, vitamin B2, vitamin B6, and vitamin B12 with the risk of depression: a systematic review and meta-analysis. **Nutrition Reviews**, 2021. No prelo.

XUE, Y. et al. Regional, socioeconomic, and dietary factors influencing B-vitamins in human milk of urban Chinese lactating women at different lactation stages. **BMC nutrition**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2017.

YANAKA, N. et al. Vitamin B6 regulates mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor-γ target genes. **Experimental and therapeutic medicine**, 2, n. 3, p. 419-424, 2011.

YANG, S.; HUTCHEON, J. A. Identifying outliers and implausible values in growth trajectory data. **Annals of epidemiology**, v. 26, n. 1, p. 77-80. e72, 2016.

YASUHI, I. et al. The effect of high-intensity breastfeeding on postpartum glucose tolerance in women with recent gestational diabetes. **International breastfeeding journal**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2017.

YUKSEL, F.; AKIN, S.; DURNA, Z. Prenatal distress in Turkish pregnant women and factors associated with maternal prenatal distress. **Journal of clinical nursing**, v. 23, n. 1-2, p. 54-64, 2014.

ZEMPLENI, J.; SUTTIE, J.W.; GREGORY, J.F.; STOVER, P.J. (org.). **Handbook of Vitamins**, 5 ed. Boca Raton, FL: CRC Press. 2013. 605 p.

ZIELINSKA, M. A. et al. Association between breastmilk LC PUFA, carotenoids and psychomotor development of exclusively breastfed infants. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 7, p. 1144, 2019.

ZIOMKIEWICZ, A. et al. Maternal distress and social support are linked to human milk immune properties. **Nutrients**, v. 13, n. 6, p. 1857, 2021.

ZIOMKIEWICZ, A. et al. Psychosocial stress and cortisol stress reactivity predict breast milk composition. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2021.

ANEXOS

ANEXO 1. Questionários e Protocolo de coleta de leite humano (online)*

*Disponível em:

https://drive.google.com/drive/folders/1J34f2P-tnYHpTfmb2-ncolZsYsMWI62l?usp=sharing

ANEXO 2. Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa - Secretaria Municipal de Saúde e defesa civil do Rio de Janeiro.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO/SMS/ RJ

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Composição do leite humano e o estado nutricional materno

Pesquisador: Gilberto Kac

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49218115.0.3001.5279

Instituição Proponente: Maternidade-Escola da UFRJ

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE

Número do Parecer: 1.629.127

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda de projeto de pesquisa apresentado a CEP co-participante sobre um estudo longitudinal prospectivo de segmento pré-natal, que tem como objetivo avaliar a composição imunológica do leite humano e sua associação com o estado nutricional e transtornos mentais. Essa emenda solicita a inclusão do crescimento e desenvolvimento infantil ao longo dos primeiros 24 meses de vida, além da amostra da microbiota do leite e das fezes da mãe.

Objetivo da Pesquisa:

* Objetivo Primário:

Avaliar a associação entre compostos bioativos do leite (imunológicos, oligossacarídeos e microbiota), da microbiota das fezes da mãe e dos seus filhos, e o crescimento físico e desenvolvimento infantil, a saúde mental materna e obesidade na gestação e no pós-parto.

* Objetivo Secundário:

1. Estudar a magnitude da associação entre o IMC pré-gestacional, o ganho de peso gestacional e a composição imunológica do leite humano;

2. Estudar a associação entre a idade gestacional e o peso no nascimento do lactente e da composição imunológica do leite humano;

Endereço: Rua Evaristo da Veiga, 16, Sobreloja
Bairro: Centro **CEP:** 20.031-040
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2215-1485 **E-mail:** cepsms@rio.rj.gov.br

3. Estudar a associação entre o estado nutricional (antropometria, fatores clínico/sociais, bioquímicos e alimentares) da nutriz e a composição imunológica do leite humano;
4. Avaliar a associação entre a composição imunológica do leite humano e variáveis sócio-econômicas maternas, transtornos mentais e atividade física;
5. Determinar a relação entre hábitos tóxicos maternos prévios e durante à gestação e a composição imunológica do leite humano;
6. Determinar alguns prébioticos oligossacarídeos no leite humano que influenciam no sistema imune;
7. Avaliar a associação entre a composição imunitária do leite humano e a microbiota intestinal do lactante;
8. Avaliar a associação entre a microbiota intestinal do lactente e o seu crescimento e desenvolvimento nos dois primeiros anos de vida;
9. Determinar a microbiota do leite materno; a microbiota e os oligossacarídeos das fezes dos bebês; e a microbiota das fezes da mãe;
10. Avaliar a correlação entre a microbiota materna, infantil e do leite materno;
11. Avaliar a associação entre a microbiota materna e a saúde mental e a obesidade materna;
12. Avaliar a saúde mental materna e a obesidade ao final da gravidez e no pós-parto, o crescimento físico e desenvolvimento infantil nos dois primeiros anos de vida;
13. Avaliar a associação entre saúde mental materna e a dieta infantil como o crescimento e desenvolvimento nos dois primeiros anos de vida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

* Riscos:

- A avaliação física, entrevista sobre saúde mental, coleta e utilização de amostras de sangue, leite e fezes serão realizados com todos os esforços para evitar possíveis danos, sejam de dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual decorrentes deste projeto de pesquisa, durante o período de gravidez ou no pós-parto para a mãe e/ou para a criança. Todas as coletas de sangue serão realizadas com material descartável, a fim de evitar contaminação. Em algumas pessoas pode aparecer um hematoma (mancha arroxeada) no local de retirada do sangue, que desaparecerá em alguns dias e não tem necessidade de atenção ou cuidado especial. O pesquisador se compromete a proporcionar de forma gratuita assistência imediata e integral ao participante da pesquisa (a mãe e/ou a criança durante e após a gestação) por qualquer dano decorrente imediato ou posterior, direto ou indireto do projeto de pesquisa pelo tempo que for necessário. O pesquisador responsável por este projeto se compromete a suspender a pesquisa

imediatamente ao perceber que ocorreu qualquer risco ou dano, previsto ou não neste termo. O problema será comunicado ao médico responsável pelo seu acompanhamento e as devidas providências serão tomadas em caráter imediato, sendo comunicado ao Comitê de Ética da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, ao Comitê de Ética da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

* Benefícios:

- A partir da identificação de componentes defensivos do leite humano e sua possível associação com as variações do estado nutricional e da dieta maternos, poderemos elaborar estratégias para melhorar a qualidade imunológica do leite materno, mediante a realização de um conselho dietético às mães lactantes. Além disso, o benefício de oferecer às crianças um alimento mais rico imunologicamente, e a melhora da saúde das gestantes e lactantes, consequentemente irá contribuir para a prevenção das complicações devido à má nutrição materna. Secundariamente, a melhora da qualidade imunológica do leite materno, serviria também para modificar o surgimento de patologias derivadas da programação fetal e neonatal por meio de um mecanismo epigenético, em relação às implicações sanitárias e sócio-econômicas que isto implica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Consideramos pertinentes e relevantes as modificações elencadas nessa emenda.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Sr.(a) Pesquisador(a),

Atentamos que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/SMS-RJ deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do pesquisador

assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas a este CEP/SMS-RJ, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Acrescentamos que o sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (item IV.3 .d., da Resolução CNS/MS Nº 466/12) e deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (item IV.5.d., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Ressaltamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_667708_E1.pdf	05/05/2016 13:51:40		Aceito
Outros	Anuencia_Clinica_Assis_Valente.pdf	05/05/2016 13:50:52	Gilberto Kac	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_completo.doc	05/05/2016 13:49:16	Gilberto Kac	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_dos_pesquisadores.docx	25/02/2016 12:58:12	Gilberto Kac	Aceito
Outros	EMENDA_01.pdf	25/02/2016 12:43:39	Gilberto Kac	Aceito
Outros	Justificativa_de_necessidade_para_utilizacao_futura_de_amostra_armazenada_em_biorrepositorio.pdf	25/02/2016 12:42:26	Gilberto Kac	Aceito
Outros	Declaracao_de_submissao_ao_sistema_CEP_CONEP_em_caso_de_novos_estudos_realizados_com_o_material_armazenado.pdf	25/02/2016 12:40:33	Gilberto Kac	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	25/02/2016 11:01:35	Gilberto Kac	Aceito
Cronograma	cronograma_de_atividades.docx	25/02/2016	Gilberto Kac	Aceito

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO/SMS/ RJ

Continuação do Parecer: 1.629.127

Cronograma	cronograma_de_atividades.docx	11:01:24	Gilberto Kac	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXO_I_TCLE.docx	25/02/2016 11:01:05	Gilberto Kac	Aceito
Outros	ANEXO_II_Questionarios.doc	15/09/2015 09:49:49	Gilberto Kac	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_pesquisador.pdf	15/09/2015 09:40:06	Gilberto Kac	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	15/09/2015 09:39:25	Gilberto Kac	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_apresentacao_do_Instituto_de_Nutricao.PDF	15/09/2015 09:38:53	Gilberto Kac	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_plataformaBrasil.pdf	15/09/2015 09:35:44	Gilberto Kac	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 08 de Julho de 2016

Assinado por:

Salesia Felipe de Oliveira

(Coordenador)

ANEXO 3. Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa - Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro

MATERNIDADE ESCOLA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO/ ME-UFRJ

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Composição do leite humano e o estado nutricional materno
Pesquisador: Gilberto Kac
Área Temática:
Versão: 3
CAAE: 49218115.0.0000.5275
Instituição Proponente: Maternidade-Escola da UFRJ
Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.568.912

Apresentação do Projeto:
É um estudo longitudinal prospectivo em três etapas de seguimento: pré-natal, puerpério imediato (até sete dias de pós-parto) e no 1º mês de pós-parto.
Tem como objetivo avaliar a composição imunológica do leite humano, e sua associação com o estado nutricional e transtornos mentais entre o terceiro trimestre de gravidez e o primeiro mês de amamentação. Incluirá 80 mães e seus neonatos com as seguintes ondas de seguimento: 30-35 semanas gestacionais, entre 0-7 dias pós-parto e no primeiro mês após o nascimento. Em todos osmomentos serão coletadas informações sobre o estado nutricional, a saúde mental, parâmetros clínicos (idade, pressão arterial, doenças prévias), bioquímicos (exames laboratoriais de rotina) e atividade fisica. As mães serão entrevistadas em 3 pontos: entre 30 e 35 semanas gestacionais, entre 0-7 dias pós-parto e no primeiro mês após o nascimento. Amostras de sangue materno serão coletadas nas três ondas de seguimento. O leite materno será coletado em dois diferentes pontos: 0-7 dias (pós-parto, colostro) e no pós-parto (até 24 meses); com determinações de alguns hormônios, citocinas, leptina, adiponectina, imunoglobulinas, complemento, moléculas de adesão e oligossacarídeos. As fezes do neonato serão coletadas na primeira semana e primeiro mês após o nascimento para a determinação da microbiota. O período de seguimento com as

Endereço: Rua das Laranjeiras, 180
Bairro: Laranjeiras **CEP:** 22.240-003
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2556-9747 **Fax:** (21)2205-9064 **E-mail:** cep@me.ufrj.br

mães e neonatos, coleta de dados e processamento serão feitos por meio de colaboração com a atenção primária. Todas as determinações serão realizadas no Instituto de Nutrição Josué de Castro (UFRJ, Brasil).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Avaliar a composição imunológica do leite humano, e sua associação com o estado nutricional e transtornos mentais entre o terceiro trimestre de gravidez e o primeiro mês de amamentação.

Objetivos específicos

-Estudar a magnitude da associação entre o IMC pré-gestacional, o ganho de peso gestacional e a composição imunológica do leite humano.

-Estudar a associação entre a idade gestacional e o peso no nascimento do lactente e da composição imunologica do leite humano.

-Estudar a associação entre o estado nutricional (antropometria, fatores clinico/sociais, bioquímicos e alimentares) da nutriz e a composição imunológica do leite humano.

- Avaliar a associação entre a microbiota intestinal do lactente e o crescimento e desenvolvimento infantil.

- Determinar a microbiota do leite materno; a microbiota e os oligossacarídeos das fezes dos recém-nascidos; a microbiota das fezes maternas.

- Avaliar a correlação entre a microbiota materna, infantil e do leite materno.

- Avaliar a associação entre a microbiota materna e a saúde mental e a obesidade materna.

- Avaliar a saúde mental materna e a obesidade ao final da gravidez e no pós-parto, o crescimento físico e desenvolvimento infantil nos dois primeiros anos de vida.

- Avaliar a associação entre a saúde mental materna e a dieta infantil com o crescimento e desenvolvimento infantil nos dois primeiros anos de vida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Esse estudo não apresenta maiores riscos, apenas aos inerentes à coleta de sangue.

Estes dados serão importantes para entender como a nutrição materna modula a homeostase imunológica e as respostas imunes que participam na defesa do lactante. Por outro lado, o equilibrio ecológico da flora intestinal pode ser modulado por modificações dietéticas de maneira favorável.

Continuação do Parecer: 1.568.912

Outros	mazenado.pdf	25/02/2016 12:40:33	Gilberto Kac	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	25/02/2016 11:01:35	Gilberto Kac	Aceito
Cronograma	cronograma_de_atividades.docx	25/02/2016 11:01:24	Gilberto Kac	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXO_I_TCLE.docx	25/02/2016 11:01:05	Gilberto Kac	Aceito
Outros	ANEXO_II_Questionarios.doc	15/09/2015 09:49:49	Gilberto Kac	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_pesquisador.pdf	15/09/2015 09:40:06	Gilberto Kac	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	15/09/2015 09:39:25	Gilberto Kac	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_apresentacao_do_Instituto_de_Nutricao.PDF	15/09/2015 09:38:53	Gilberto Kac	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_plataformaBrasil.pdf	15/09/2015 09:35:44	Gilberto Kac	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIO DE JANEIRO, 01 de Junho de 2016

Assinado por:
Ivo Basílio da Costa Júnior

Endereço: Rua das Laranjeiras, 180
Bairro: Laranjeiras **CEP:** 22.240-003
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2556-9747 **Fax:** (21)2205-9064 **E-mail:** cep@me.ufrj.br

ANEXO 4. Termo de consentimento livre e esclarecido.

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Observatório de Epidemiologia Nutricional
Amamentação: Saúde para a mãe e o bebê

INJC

Você está sendo convidada a fazer parte da pesquisa **"Composição imunológica do leite humano e sua relação com o estado nutricional materno"** desenvolvida por pesquisadores do Observatório de Epidemiologia Nutricional, do Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro (INJC/UFRJ). Este estudo tem por objetivo principal avaliar a composição imunológica do leite materno e sua relação com o peso, altura, hábitos alimentares, saúde mental e desenvolvimento infantil.

Você não é obrigada a participar e mesmo aceitando fazer parte do estudo, poderá desistir e retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem nenhum problema. Sua recusa em participar do estudo não trará nenhum problema em sua relação com o pesquisador, com o seu médico ou com o centro de saúde ou maternidade, ou seja, você poderá seguir normalmente com o seu atendimento nesta unidade de saúde.

Como irei participar?

Você passará por avaliações do seu estado nutricional (peso e altura) e de saúde geral, totalizando **6 encontros** com nossa equipe:

- Primeiro: durante o pré-natal (entre 30 e 35 semanas de gestação);
- Segundo: até 7 dias após o parto;
- Terceiro: entre 28 e 45 dias após o parto;
- Quarto: entre 89 e 119 dias após o parto;
- Quinto: 6 meses após o parto;
- Sexto: 12 meses após o parto;

Todas estas avaliações serão preferencialmente agendadas em dias em que você já tenha que vir a Clínica da Família Assis Valente, a fim de evitar despesas extras com transporte. Os encontros terão duração aproximada de 60 minutos.

Durante os encontros, você irá responder algumas perguntas e preencher questionários com informações sobre sua identificação e localização (endereço e telefone); dados demográficos (estado civil, idade); situação socioeconômica (escolaridade, renda); hábitos de vida (uso de álcool, fumo, prática de atividade física e alimentação), uso de medicamentos; saúde mental (perguntas sobre depressão e ansiedade) e desenvolvimento do seu bebê. Você poderá receber ligações telefônicas da equipe de pesquisa para resgatar informações, bem como para o agendamento dos encontros.

Em todos os encontros iremos avaliar seu peso e altura. Amostras de sangue serão coletadas 3 vezes (no primeiro, segundo e terceiro encontros) e serão armazenadas e utilizadas para a realização de exames como, por exemplo, hemograma, dosagem de açúcares, gorduras e hormônios. Você deverá coletar 2 vezes (no segundo e terceiro encontros) cerca de 20 mL do seu leite, de forma manual, para que possamos analisar sua composição. Você também irá coletar suas fezes 3 vezes (primeiro, segundo e terceiro encontros) e de seu bebê 2 vezes (segundo e terceiro encontros) para que possamos realizar análises laboratoriais. Para isto, forneceremos o recipiente adequado e um isopor para armazenamento durante o transporte, o qual deverá ser trazido nos dias solicitados. As fezes deverão ser coletadas no mesmo dia da avaliação e deverão ser mantidas refrigeradas até a entrega à equipe de pesquisa. Seu bebê também será avaliado, sendo realizadas medidas de peso e comprimento e a partir do quarto até o sétimo encontro você irá responder perguntas relacionadas ao desenvolvimento cognitivo e motor do seu bebê.

As amostras de sangue, leite e fezes serão armazenadas no INJC/UFRJ, por um prazo de até 10 anos e ficarão sob responsabilidade institucional e gerenciamento do pesquisador responsável pela pesquisa, sem fins comerciais, em um sistema seguro de identificação, garantindo o sigilo, o respeito à confidencialidade e à recuperação dos dados para fornecimento de informações de interesse da pesquisa. As amostras poderão ser utilizadas em pesquisas futuras, as quais serão avaliadas por Comitês de Ética em Pesquisa (CEP´s) e outras análises não previstas neste estudo poderão ser realizadas mediante sua autorização por meio de um novo termo de consentimento livre e esclarecido.

Todos os exames laboratoriais, bem como a avaliação nutricional e do estado de saúde serão realizados sem custos para o participante da pesquisa.

Rubrica do participante: _____

Rubrica do pesquisador: _____

Quais os benefícios?

Ao participar deste estudo, você terá a oportunidade de realizar uma avaliação sobre seu estado de saúde, que poderá auxiliar na saúde do seu bebê. Você terá acesso a todos os seus resultados se assim desejar. Os resultados desta pesquisa poderão trazer benefícios para futuras mães e seus bebês. Além disso, você será informada caso seja detectado algum problema de saúde e aconselhada a procurar o profissional adequado para o acompanhamento.

Quais os riscos?

A avaliação do estado nutricional, entrevista sobre saúde mental, coleta e utilização de amostras de sangue, leite e fezes serão realizados com todos os esforços para evitar possíveis danos, sejam de dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual decorrentes deste projeto de pesquisa, durante o período de gravidez ou no pós-parto para a mãe e/ou para a criança. Todas as coletas de sangue serão realizadas com **material descartável, a fim de evitar contaminação.** Em algumas pessoas pode aparecer um hematoma (mancha arroxeada) no local de retirada do sangue, que desaparecerá em poucos dias e não tem necessidade de atenção ou cuidado especial.

O pesquisador se compromete a proporcionar de forma gratuita assistência imediata e integral ao participante da pesquisa (mãe ou criança durante e após a gestação) por qualquer dano decorrente imediato ou posterior, direto ou indireto do projeto de pesquisa pelo tempo que for necessário. O pesquisador responsável por este projeto se compromete a suspender a pesquisa imediatamente ao perceber que ocorreu qualquer risco ou dano, previsto ou não neste termo. O problema será comunicado ao médico responsável pelo seu acompanhamento e as devidas providências serão tomadas em caráter imediato, sendo comunicado ao Comitê de Ética da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, ao Comitê de Ética da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Responsabilidades do pesquisador

Todas as informações que você fornecer serão mantidas em sigilo e utilizadas apenas para fins de pesquisa. Nenhuma outra pessoa ou profissional terá acesso a suas informações, somente os pesquisadores. Quando divulgarmos os resultados deste trabalho, seu nome e localização **NÃO serão revelados.**

Este termo de consentimento é um documento importante e você irá receber uma via na qual consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, **podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento**.

Uma via deste consentimento informado será arquivada no Observatório de Epidemiologia Nutricional, do INJC/UFRJ.

Meu consentimento

Li e concordo em participar desta pesquisa.

Rio de Janeiro, _____/_____/_____

_____

Nome e assinatura do pesquisador

_____

Nome e assinatura do participante da pesquisa

Contato do coordenador da pesquisa
Professor Dr. Gilberto Kac
Observatório de Epidemiologia Nutricional
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Universidade Federal do Rio de Janeiro (INJC/UFRJ)
Telefones: 39386595 **/ 993152301**
E-mail: gilberto.kac@gmail.com

Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil / Comitê de Ética em Pesquisa
Rua Evaristo da Veiga, 16 – Sobreloja - Centro
Cep – 20031-040
Telefone: 22151485
E-mail: cepsms@rio.rj.gov.br

ANEXO 5. Artigo 1. Factors associated with longitudinal changes in B-vitamin and choline concentrations of human milk.

Original Research Communications

Factors associated with longitudinal changes in B-vitamin and choline concentrations of human milk

Mônica A Batalha,[1] Ana LL Ferreira,[1] Nathalia C Freitas-Costa,[1] Amanda CC Figueiredo,[1] Thais RB Carrilho,[1] Setareh Shahab-Ferdows,[2] Daniela Hampel,[2,3] Lindsay H Allen,[2,3] Rafael Pérez-Escamilla,[4] and Gilberto Kac[1]

[1]Nutritional Epidemiology Observatory, Josué de Castro Nutrition Institute, Rio de Janeiro Federal University, Rio de Janeiro, Brazil; [2]USDA/Agricultural Research Service Western Human Nutrition Research Center, Davis, CA, USA; [3]Department of Nutrition, University of California, Davis, Davis, CA, USA; and [4]Department of Social and Behavioral Sciences, Yale School of Public Health, New Haven, CT, USA

ABSTRACT

Background: Little is known regarding the associations between maternal factors and B-vitamin and choline concentrations in early milk and the trajectories of these vitamins during lactation.

Objectives: In this hypothesis-generating study, we modeled the association between maternal and offspring factors and longitudinal changes in milk B-vitamin and choline concentrations throughout lactation.

Methods: A hundred women were studied in a prospective birth cohort and milk samples from 52 women were collected at 2–8 d, 76 women at 28–50 d, and 42 women at 88–119 d postpartum. Maternal dietary intake during pregnancy and lactation was assessed by an FFQ. Linear mixed-effects models with interaction terms were used to evaluate changes in milk B-vitamin and choline concentrations over time based on maternal factors and the early postpartum concentrations of these micronutrients.

Results: The women with higher early postpartum milk concentrations of niacin ($\beta_{interaction} = -0.02$; SE = 0.00; $P < 0.001$), pantothenic acid ($\beta_{interaction} = -0.10$; SE = 2.56; $P < 0.001$), vitamin B-12 ($\beta_{interaction} = -0.10$; SE = 0.03; $P < 0.001$), and choline ($\beta_{interaction} = -0.90$; SE = 0.18; $P < 0.001$) exhibited a decrease in their concentrations throughout lactation. The participants with overweight and obesity prepregnancy experienced an increase in milk vitamin B-12 concentrations over time ($\beta_{interaction} = 0.04$; SE = 0.02; $P = 0.06$). In contrast, a decrease in vitamin B-12 concentration was observed among women with vitamin B-12 intake below the RDA during pregnancy ($\beta_{interaction} = -0.08$; SE = 0.05; $P = 0.07$). The women with niacin intake below the RDA during lactation experienced an increase in milk concentrations over time ($\beta_{interaction} = 0.01$; SE = 0.01; $P = 0.03$). A gestational age at birth >40 wk was associated with an increase in milk choline concentration throughout lactation ($\beta_{interaction} = 0.54$; SE = 0.16; $P < 0.01$).

Conclusions: Changes in B-vitamin and choline concentrations in human milk over time may be associated with the early concentrations of these micronutrients in milk, maternal prepregnancy BMI, dietary intake, and gestational age at delivery. *Am J Clin Nutr* 2021;00:1–14.

Keywords: maternal micronutrient intakes, human milk micronutrient concentrations, changes in human milk micronutrient concentrations, B vitamins, choline, pregnancy, lactation

Introduction

The benefits of breastfeeding for both mothers and infants are well described in the literature (1). One of the key breastfeeding recommendations of the WHO is for infants to be exclusively breastfed for the first 6 mo of life (2, 3). Consequently, there is a need to understand the adequacy of human milk composition because it serves as the only source of nutrients for many children in their first 6 mo of life (4).

B vitamins and choline are classified as group I micronutrients in human milk because they are all affected by maternal status. Therefore, they are subject to decreased concentrations in maternal deficiency cases. Thus, they are of great public health interest. Folate, on the other hand, is classified as a group II micronutrient and is unaffected by maternal status or intake (5).

Supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grant 409676/2016 (to GK), Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of Rio de Janeiro State (FAPERJ) grant E-26/210.190/2014 (to GK), and intramural USDA-Agricultural Research Service project 5306-51000-004-00D (to LHA). GK received a research productivity scholarship from CNPq. Supported also in part by *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil* (CAPES) Finance Code 001 (to MAB).

Supplemental Tables 1–6 and Supplemental Figures 1–3 are available from the "Supplementary data" link in the online posting of the article and from the same link in the online table of contents at https://academic.oup.com/ajcn/.

Address correspondence to GK (e-mail: gilberto.kac@gmail.com).

Abbreviations used: AI, Adequate Intake; ASF, animal-source food; H-AR, Harmonized Average Requirement; TP, time point; UPLC-MS/MS, ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry.

Received October 19, 2020. Accepted for publication May 17, 2021.

First published online 0, 2021; doi: https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab191.

 © The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of the American Society for Nutrition. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

ANEXO 6. Scripts das análises estatísticas-Artigo 1

Tabela 1 (realizada no STATA)

```
tab idade_mae2 if visitas==1 & id_micronutriente==1
tab estudomae_cat if visitas==1 & id_micronutriente==1
tab cor_autodeclarada if id_micronutriente==1
tab cat_new_imc_pre if visitas==1 & id_micronutriente==1
tab paridade_cat if visitas==1 & id_micronutriente==1
tab vitb_gest if visitas==1 & id_micronutriente==1
tab fuma_atual if visitas==1 & id_micronutriente==1
tab alcool_cons_gest if visitas==1 & id_micronutriente==1
tab tipo_parto if visita==1 & id_micronutriente==1
tab ga_parto_cat if visita==4 & id_micronutriente==1
tab tipo_aleitamentoo4o5 if visita==4 & id_micronutriente==1
```

Tabela 2 (realizada no STATA)

```
sum vit_b1_totalgest if id_micronutriente==1& visitas==1, d
sum vit_b2_totalgest if id_micronutriente==1& visitas==1, d
sum vit_b3_totalgest if id_micronutriente==1& visitas==1, d
sum vit_b5_totalgest if id_micronutriente==1& visitas==1, d
sum vit_b6_totalgest if id_micronutriente==1& visitas==1, d
sum vit_b12_totalgest if id_micronutriente==1& visitas==1, d
sum colina_totalgest if id_micronutriente==1& visitas==1, d
sum g2_carnebov if id_micronutriente==1& visitas==1, d
sum g2_frango if id_micronutriente==1& visitas==1, d
sum g2_peixe if id_micronutriente==1& visitas==1, d
sum g3_ovos if id_micronutriente==1& visitas==1, d
sum g4_leite if id_micronutriente==1& visitas==1, d
```

```
sum vit_b1_totalpp if id_micronutriente==1& visitas==6, d
sum vit_b2_totalpp if id_micronutriente==1& visitas==6, d
sum vit_b3_totalpp if id_micronutriente==1& visitas==6, d
sum vit_b5_totalpp if id_micronutriente==1& visitas==6, d
sum vit_b6_totalpp if id_micronutriente==1& visitas==6, d
sum vit_b12_totalpp if id_micronutriente==1& visitas==6, d
sum colina_totalpp if id_micronutriente==1& visitas==6, d
sum g2_carnebov_pp  if id_micronutriente==1& visitas==6, d
sum g2_frango_pp if id_micronutriente==1& visitas==6, d
sum g2_peixe_pp  if id_micronutriente==1& visitas==6, d
sum g3_ovos_pp  if id_micronutriente==1& visitas==6, d
sum g4_leite_pp  if id_micronutriente==1& visitas==6, d

tab adeqb1_cat_gest if id_micronutriente==1& visitas==1
tab adeqb2_cat_gest if id_micronutriente==1& visitas==1
tab adeqb3_cat_gest if id_micronutriente==1& visitas==1
tab adeqb5_cat_gest if id_micronutriente==1& visitas==1
tab adeqb6_cat_gest if id_micronutriente==1& visitas==1
tab adeqb12_cat_gest if id_micronutriente==1& visitas==1
tab adeqcolina_cat_gest if id_micronutriente==1& visitas==1

tab adeqb1_pp if id_micronutriente==1& visitas==6
tab adeqb1_cat_pp if id_micronutriente==1& visitas==6
tab adeqb2_cat_pp if id_micronutriente==1& visitas==6
tab adeqb3_cat_pp if id_micronutriente==1& visitas==6
tab adeqb5_cat_pp if id_micronutriente==1& visitas==6
tab adeqb6_cat_pp if id_micronutriente==1& visitas==6
tab adeqb12_cat_pp if id_micronutriente==1& visitas==6
tab adeqcolina_cat_pp if id_micronutriente==1& visitas==6
```

```
signrank g2_carnebov=g2_carnebov_pp if visitas==1
signrank g2_frango= g2_frango_pp if visitas==1
signrank g2_peixe= g2_peixe_pp if visitas==1
signrank g3_ovos=g3_ovos_pp if visitas==1
signrank g4_leite=g4_leite_pp if visitas==1
signrank new_kcal_totalgest=new_kcal_totalpp if visitas==1
signrank vit_b1_totalgest=vit_b1_totalpp if visitas==1
signrank vit_b2_totalgest=vit_b2_totalpp if visitas==1
signrank vit_b3_totalgest=vit_b3_totalpp if visitas==1
signrank vit_b5_totalgest=vit_b5_totalpp if visitas==1
signrank vit_b6_totalgest=vit_b6_totalpp if visitas==1
signrank vit_b12_totalgest=vit_b12_totalpp if visitas==1
signrank colina_totalgest=colina_totalpp if visitas==1
```

Tabela 3 (realizada no STATA)

```
signrank vitB1_HM3=vitB1_HM4
signrank vitB1_HM3=vitB1_HM5
signrank vitB1_HM4=vitB1_HM5

signrank vitB2_HM3=vitB2_HM4
signrank vitB2_HM3=vitB2_HM5
signrank vitB2_HM4=vitB2_HM5

signrank vitB3_HM3=vitB3_HM4
signrank vitB3_HM3=vitB3_HM5
signrank vitB3_HM4=vitB3_HM5

signrank vitB5_HM3=vitB5_HM4
signrank vitB5_HM3=vitB5_HM5
signrank vitB5_HM4=vitB5_HM5
```

```
signrank vitB6_HM3=vitB6_HM4

signrank vitB6_HM3=vitB6_HM5

signrank vitB6_HM4=vitB6_HM5


signrank vitB12_HM3=vitB12_HM4

signrank vitB12_HM3=vitB12_HM5

signrank vitB12_HM4=vitB12_HM5


signrank choline_HM3=choline_HM4

signrank choline_HM3=choline_HM5

signrank choline_HM4=choline_HM5


reshape long vitB1_HM vitB2_HM vitB3_HM vitB5_HM vitB6_HM vitB12_HM choline_HM, i(record_id) j(visitas)

skilmack vitB1_HM , id(record_id) repeated(visitas)

skilmack vitB2_HM , id(record_id) repeated(visitas)

skilmack vitB3_HM , id(record_id) repeated(visitas)

skilmack vitB5_HM , id(record_id) repeated(visitas)

skilmack vitB6_HM , id(record_id) repeated(visitas)

skilmack vitB12_HM , id(record_id) repeated(visitas)

skilmack choline_HM , id(record_id) repeated(visitas)
```

Figuras 2 a 5 e Tabelas Suplementares 2 a 6 (realizados no R)

Tabela suplementar 2 e figura2

```
banco_n <- banco_n %>% rename(upper_tertile_b1=tercil_B1)

banco_n$upper_tertile_b1<- factor(banco_n$upper_tertile_b1, labels = c("No","Yes"))

table(banco_n$upper_tertile_b1)

m1_b1_tercil<-
lmer(vitB1_HM~idade_bebe_lh*upper_tertile_b1+I(idade_bebe_lh^2)+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE, control = lmerControl(optimizer = "Nelder_Mead"))

summary(m1_b1_tercil)
```

```
tertil_b1g<-interact_plot(m1_b1_tercil,pred=idade_bebe_lh,modx=upper_tertile_b1, data= banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE,y.label ="Thiamin",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+scale_y_continuous(breaks = seq(0,180, by =25))+ theme_classic()+theme(legend.position = "none")+ theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ggtitle("A")+theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

tertil_b1g


banco_n <- banco_n %>% rename(upper_tertile_b2=tercil_B2)

banco_n$upper_tertile_b2<- factor(banco_n$upper_tertile_b2, labels = c("No","Yes"))

table(banco_n$upper_tertile_b2)

m1_b2_tercil<-
lmer(B2_transf~idade_bebe_lh*upper_tertile_b2+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id),
data=banco_n,REML=FALSE, control = lmerControl(optimizer = "Nelder_Mead"))

summary(m1_b2_tercil)

tertil_b2g<-interact_plot(m1_b2_tercil,pred=idade_bebe_lh,modx=upper_tertile_b2,data=banco_n,
colors=c("black","gray50"), interval = TRUE,y.label ="Riboflavin",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+scale_y_continuous(breaks = seq(0.01,0.15, by =0.015))+theme_classic()+theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ggtitle("B")+theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

tertil_b2g


banco_n <- banco_n %>% rename(upper_tertile_b3=tercil_B3)

banco_n$upper_tertile_b3<- factor(banco_n$upper_tertile_b3, labels = c("1st and 2nd tertile","3rd tertile"))

table(banco_n$upper_tertile_b3)

m1_b3_tercil<-
lmer(log(vitB3_HM)~idade_bebe_lh*upper_tertile_b3+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id),
data=banco_n,REML=FALSE, control = lmerControl(optimizer = "Nelder_Mead"))

summary(m1_b3_tercil)

tertil_b3g<-interact_plot(m1_b3_tercil,pred=idade_bebe_lh,modx=upper_tertile_b3,data=banco_n,
colors=c("black","gray50"), interval = TRUE,y.label ="Niacin",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+ scale_y_continuous(breaks = seq(5,8, by =0.40))+ theme_classic()+ theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size
```

```
= 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ ggtitle("C")+theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

tertil_b3g


banco_n <- banco_n %>% rename(upper_tertile_b5= tercil_B5)

banco_n$upper_tertile_b5<- factor(banco_n$upper_tertile_b5, labels = c("No","Yes"))

table(banco_n$upper_tertile_b5)

m1_b5_tercil<-
lmer(vitB5_HM~idade_bebe_lh*upper_tertile_b5+I(idade_bebe_lh^2)+I(idade_bebe_lh^3)+(1|record_id)
+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE, control = lmerControl(optimizer =
"Nelder_Mead"))

summary(m1_b5_tercil)

tertil_b5g<-interact_plot(m1_b5_tercil,pred=idade_bebe_lh,modx=upper_tertile_b5,data=banco_n,
colors=c("black","gray50"), interval = TRUE,y.label ="Pantothenic acid",line.thickness = 0.3,
x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+scale_y_continuous(breaks
= seq(0,2100, by =300))+ theme_classic()+theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x =
element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000",
size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line
= element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ggtitle("D")+theme(plot.title =
element_text(size =5,hjust=0.5))

tertil_b5g


banco_n <- banco_n %>% rename(upper_tertile_b6=tercil_B6)

banco_n$upper_tertile_b6<- factor(banco_n$upper_tertile_b6, labels = c("No","Yes"))

table(banco_n$upper_tertile_b6)

m1_b6_tercil<-
lmer(B6_transf~idade_bebe_lh*upper_tertile_b6+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id),
data=banco_n,REML=FALSE, control = lmerControl(optimizer = "Nelder_Mead"))

summary(m1_b6_tercil)

tertil_b6g<-interact_plot(m1_b6_tercil,pred=idade_bebe_lh,modx=upper_tertile_b6,data=banco_n,
colors=c("black","gray50"), interval = TRUE,y.label ="B-6",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum
days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+ scale_y_continuous(breaks = seq(0,18, by =3))+
theme_classic()+ theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y =
element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y =
element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size
= 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ggtitle("E")+theme(plot.title = element_text(size
=5,hjust=0.5))

tertil_b6g
```

```
banco_n <- banco_n %>% rename(upper_tertile_b12=tercil_B12)

banco_n$upper_tertile_b12<- factor(banco_n$upper_tertile_b12, labels = c("No","Yes"))

table(banco_n$upper_tertile_b12)

m1_b12_tercil<-
lmer(B12_transf~idade_bebe_lh*upper_tertile_b12+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id),
data=banco_n,REML=FALSE, control = lmerControl(optimizer = "Nelder_Mead"))

summary(m1_b12_tercil)

tertil_b12g<-interact_plot(m1_b12_tercil,pred=idade_bebe_lh,modx=upper_tertile_b12,data=banco_n,
colors=c("black","gray50"), interval = TRUE,y.label ="B-12",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum
days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+ scale_y_continuous(breaks = seq(11,30, by
=3))+ theme_classic()+theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x = element_text( size
=5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y =
element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size
= 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ggtitle("F")+ theme(plot.title = element_text(size
=5,hjust=0.5))

tertil_b12g


banco_n <- banco_n %>% rename(upper_tertile_choline=tercil_choline)

banco_n$upper_tertile_choline<- factor(banco_n$upper_tertile_choline, labels = c("1st and 2nd
tertiles","3rd tertile"))

table(banco_n$upper_tertile_choline)

m1_choline_tercil<-
lmer(choline_HM~idade_bebe_lh*upper_tertile_choline+I(idade_bebe_lh^2)+(1|record_id)+(0+idade_be
be_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE, control = lmerControl(optimizer = "Nelder_Mead"))

summary(m1_choline_tercil)

tertil_cholineg<-
interact_plot(m1_choline_tercil,pred=idade_bebe_lh,modx=upper_tertile_choline,data=banco_n,
colors=c("black","gray50"), interval = TRUE,y.label ="Choline",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum
days")+ scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+scale_y_continuous(breaks = seq(60,200, by
=24))+theme_classic()+ theme(legend.position = "none")+ theme(axis.title.x = element_text( size
=5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y =
element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size
= 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ggtitle("G")+theme(plot.title = element_text(size
=5,hjust=0.5))

tertil_cholineg


legend4 <- get_legend(tertil_cholineg2)

tertiles<-
grid.arrange(tertil_b1g,tertil_b2g,tertil_b3g,tertil_b5g,tertil_b6g,tertil_b12g,tertil_cholineg,legend4,
ncol=2, nrow=4)
```

```
tertiles

ggsave("tertiles_n1.tiff",tertiles,width=7,height=10,units= c("cm"), dpi=600)
```

Tabela suplementar 3 e figura3

```
banco_n <- banco_n %>% rename(Prepregnancy_BMI=imcpre_cat)

banco_n$Prepregnancy_BMI<- factor(banco_n$Prepregnancy_BMI, labels = c("Underweight and normal weight","Overweight and obesity"))

table(banco_n$Prepregnancy_BMI)


m1_b1_imc<-
lmer(vitB1_HM~idade_bebe_lh*Prepregnancy_BMI+paridade+I(idade_bebe_lh^2)+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE, control = lmerControl(optimizer = "Nelder_Mead"))

summary(m1_b1_imc)

imc_b1g<-interact_plot(m1_b1_imc,pred=idade_bebe_lh,modx=Prepregnancy_BMI, data= banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "Thiamin",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+scale_y_continuous(breaks = seq(0,180, by =25))+ theme_classic()+theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ggtitle("A")+theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

imc_b1g


m1_b2_imc<-
lmer(B2_transf~idade_bebe_lh*Prepregnancy_BMI+paridade+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE, control = lmerControl(optimizer = "Nelder_Mead"))

summary(m1_b2_imc)

imc_b2g<-interact_plot(m1_b2_imc,pred=idade_bebe_lh,modx=Prepregnancy_BMI, data= banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "Riboflavin",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum days")+ scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+scale_y_continuous(breaks = seq(0.08,0.12, by =0.007))+ theme_classic()+theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ggtitle("B")+ theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

imc_b2g
```

```
m1_b3_imc<-
lmer(log(vitB3_HM)~idade_bebe_lh*Prepregnancy_BMI+paridade+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE, control = lmerControl(optimizer = "Nelder_Mead"))

summary(m1_b3_imc)

imc_b3g<-interact_plot(m1_b3_imc,pred=idade_bebe_lh,modx=Prepregnancy_BMI, data= banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "Niacin",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+ scale_y_continuous(breaks = seq(5.5,7.5, by =0.20))+ theme_classic()+theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ ggtitle("C")+theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

imc_b3g


m1_b5_imc<-
lmer(vitB5_HM~idade_bebe_lh*Prepregnancy_BMI+paridade+I(idade_bebe_lh^2)+I(idade_bebe_lh^3)+ (1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE, control = lmerControl(optimizer = "Nelder_Mead"))

summary(m1_b5_imc)

imc_b5g<-interact_plot(m1_b5_imc,pred=idade_bebe_lh,modx=Prepregnancy_BMI, data= banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "Pantothenic acid",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+scale_y_continuous(breaks = seq(0,2400, by =300))+ theme_classic()+ theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ ggtitle("D")+ theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

imc_b5g


m1_b6_imc<-
lmer(B6_transf~idade_bebe_lh*Prepregnancy_BMI+paridade+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id ), data=banco_n,REML=FALSE, control = lmerControl(optimizer = "Nelder_Mead"))

summary(m1_b6_imc)

imc_b6g<-interact_plot(m1_b6_imc,pred=idade_bebe_lh,modx=Prepregnancy_BMI, data= banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "B-6",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+scale_y_continuous(breaks = seq(0,18, by =2))+theme_classic()+theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ggtitle("E")+theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

imc_b6g
```

```
m1_b12_imc<-
lmer(B12_transf~idade_bebe_lh*Prepregnancy_BMI+paridade+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE, control = lmerControl(optimizer = "Nelder_Mead"))

summary(m1_b12_imc)

imc_b12g<-interact_plot(m1_b12_imc,pred=idade_bebe_lh,modx=Prepregnancy_BMI, data= banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "B-12",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum days")+ scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+scale_y_continuous(breaks = seq(6,24, by =1.8))+theme_classic()+theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ggtitle("F")+ theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

imc_b12g


m1_choline_imc<-
lmer(choline_HM~idade_bebe_lh*Prepregnancy_BMI+paridade+I(idade_bebe_lh^2)+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE, control = lmerControl(optimizer = "Nelder_Mead"))

summary(m1_choline_imc)

imc_cholineg<-interact_plot(m1_choline_imc,pred=idade_bebe_lh,modx=Prepregnancy_BMI, data= banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "Choline",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+scale_y_continuous(breaks = seq(80,180, by =15))+ theme_classic()+ theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ ggtitle("G")+theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

imc_cholineg

legend3 <- get_legend(imc_cholineg2)

imc_prefig<-grid.arrange(imc_b1g,imc_b2g,imc_b3g,imc_b5g,imc_b6g,imc_b12g,imc_cholineg,legend3, ncol=2, nrow=4)

imc_prefig

ggsave("figure3.tiff",imc_prefig,device="tiff",width=7,height=10,units= c("cm"), dpi=600)
```

####Tabela suplementar 4 e figura4

```
banco_n <- banco_n %>% rename(Pregnancy_intakeB1=adeqb1_cat_gest)

banco_n$Pregnancy_intakeB1<- factor(banco_n$Pregnancy_intakeB1, labels = c("Above","Below"))

table(banco_n$Pregnancy_intakeB1)
```

```
m1_b1_cons_gest<-
lmer(vitB1_HM~idade_bebe_lh*Pregnancy_intakeB1+imc_pre+suple_vitb_gest+I(idade_bebe_lh^2)+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE)

summary(m1_b1_cons_gest)

cons_gest_b1g<-interact_plot(m1_b1_cons_gest,pred=idade_bebe_lh,modx=Pregnancy_intakeB1, data= banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label="Thiamin",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum days")+ scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+scale_y_continuous(breaks = seq(0,150, by =30))+ theme_classic()+ theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ ggtitle("A")+ theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

cons_gest_b1g


banco_n <- banco_n %>% rename(Pregnancy_intakeB2=adeqb2_cat_gest)

banco_n$Pregnancy_intakeB2<- factor(banco_n$Pregnancy_intakeB2, labels = c("Above","Below"))

table(banco_n$Pregnancy_intakeB2)

m1_b2_cons_gest<-
lmer(B2_transf~idade_bebe_lh*Pregnancy_intakeB2+imc_pre+suple_vitb_gest+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE)

summary(m1_b2_cons_gest)

cons_gest_b2g<-interact_plot(m1_b2_cons_gest,pred=idade_bebe_lh,modx=Pregnancy_intakeB2, data= banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "Riboflavin",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+ scale_y_continuous(breaks = seq(0.05,0.12, by =0.010))+ theme_classic()+theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ggtitle("B")+theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

cons_gest_b2g


banco_n <- banco_n %>% rename(Pregnancy_intakeB3=adeqb3_cat_gest)

banco_n$Pregnancy_intakeB3<- factor(banco_n$Pregnancy_intakeB3, labels = c("Above","Below"))

table(banco_n$Pregnancy_intakeB3)

m1_b3_cons_gest<-lmer(log(vitB3_HM)
~idade_bebe_lh*Pregnancy_intakeB3+imc_pre+suple_vitb_gest+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE)

summary(m1_b3_cons_gest)

cons_gest_b3g<-interact_plot(m1_b3_cons_gest,pred=idade_bebe_lh,modx=Pregnancy_intakeB3, data= banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "Niacin",line.thickness = 0.3,
```

```
x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+scale_y_continuous(breaks = seq(5,8, by =0.25))+ theme_classic()+theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ggtitle("C")+theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

cons_gest_b3g


banco_n <- banco_n %>% rename(Pregnancy_intakeB5=adeqb5_cat_gest)

banco_n$Pregnancy_intakeB5<- factor(banco_n$Pregnancy_intakeB5, labels = c("Above","Below"))

table(banco_n$Pregnancy_intakeB5)

m1_b5_cons_gest<-
lmer(vitB5_HM~idade_bebe_lh*Pregnancy_intakeB5+imc_pre+suple_vitb_gest+I(idade_bebe_lh^2)+I(idade_bebe_lh^3)+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE)

summary(m1_b5_cons_gest)

cons_gest_b5g<-interact_plot(m1_b5_cons_gest,pred=idade_bebe_lh,modx=Pregnancy_intakeB5, data= banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "Pantothenic acid",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+scale_y_continuous(breaks = seq(0,2250, by =280))+theme_classic()+ theme(legend.position = "none")+ theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ ggtitle("D")+ theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

cons_gest_b5g


banco_n <- banco_n %>% rename(Pregnancy_intakeB6=adeqb6_cat_gest)

banco_n$Pregnancy_intakeB6<- factor(banco_n$Pregnancy_intakeB6, labels = c("Above","Below"))

table(banco_n$Pregnancy_intakeB6)

m1_b6_cons_gest<-
lmer(B6_transf~idade_bebe_lh*Pregnancy_intakeB6+imc_pre+suple_vitb_gest+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE)

summary(m1_b6_cons_gest)

cons_gest_b6g<-interact_plot(m1_b6_cons_gest,pred=idade_bebe_lh,modx=Pregnancy_intakeB6, data= banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "B-6",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+scale_y_continuous(breaks = seq(0,16, by =2))+ theme_classic()+theme(legend.position = "none")+ theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ggtitle("E")+theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))
```

```
cons_gest_b6g


banco_n <- banco_n %>% rename(Pregnancy_intakeB12=adeqb12_cat_gest)

banco_n$Pregnancy_intakeB12<- factor(banco_n$Pregnancy_intakeB12, labels = c("Above","Below"))

table(banco_n$Pregnancy_intakeB12)

m1_b12_cons_gest<-
lmer(B12_transf~idade_bebe_lh*Pregnancy_intakeB12+imc_pre+suple_vitb_gest+(1|record_id)+(0+idad
e_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE)

summary(m1_b12_cons_gest)

cons_gest_b12g<-interact_plot(m1_b12_cons_gest,pred=idade_bebe_lh,modx=Pregnancy_intakeB12,
data= banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "B-12",line.thickness = 0.3,
x.label="Postpartum days")+ scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+
scale_y_continuous(breaks = seq(5,30, by =4.5))+ theme_classic()+theme(legend.position =
"none")+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x =
element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks =
element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05,
"cm"))+ggtitle("F")+theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

cons_gest_b12g


banco_n <- banco_n %>% rename(Pregnancy_intakecholine=adeqcolina_cat_gest)

banco_n$Pregnancy_intakecholine<- factor(banco_n$Pregnancy_intakecholine, labels =
c("Above","Below"))

table(banco_n$Pregnancy_intakecholine)


m1_choline_cons_gest<-
lmer(choline_HM~idade_bebe_lh*Pregnancy_intakecholine+imc_pre+suple_vitb_gest+I(idade_bebe_lh^
2)+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE)

summary(m1_choline_cons_gest)

cons_gest_cholineg<-
interact_plot(m1_choline_cons_gest,pred=idade_bebe_lh,modx=Pregnancy_intakecholine, data=
banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, legend.main = "Maternal dietary intake during
\npregnancy according to the \nrecommendations*", y.label= "Choline",line.thickness = 0.3,
x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+
scale_y_continuous(breaks = seq(0,200, by =18))+ theme_classic()+ theme(legend.position = "none")+
theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x =
element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks =
element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+
ggtitle("G")+ theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

cons_gest_cholineg
```

```
m1_choline_cons_gest2<-lmer(choline_HM
~idade_bebe_lh*Pregnancy_intakecholine+imc_pre+suple_vitb_gest+I(idade_bebe_lh^2)+(1|record_id)+(
0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE)

summary(m1_choline_cons_gest)

cons_gest_cholineg2<-
interact_plot(m1_choline_cons_gest,pred=idade_bebe_lh,modx=Pregnancy_intakecholine, data=
banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE,  legend.main = "Maternal dietary intake during
\npregnancy according to the \nrecommendations*", y.label= "Choline",line.thickness = 0.3,
x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+
scale_y_continuous(breaks = seq(0,200, by =18))+ theme_classic()+ theme(legend.title =
element_text(color = "black",  size =5), legend.text = element_text(color = "black", size =
5))+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x =
element_text(color="#000000", size =3),axis.text.y = element_text(color="#000000", size
=3))+ggtitle("G")+ theme(plot.title = element_text(size =7,hjust=0.5)+ theme(axis.ticks =
element_line(size = 0.5), axis.line = element_line(size = 0.3)))

cons_gest_cholineg2


legend <- get_legend(cons_gest_cholineg2)

figure_consgest<-
ggarrange(cons_gest_b1g,cons_gest_b2g,cons_gest_b3g,cons_gest_b5g,cons_gest_b6g,cons_gest_b12g,c
ons_gest_cholineg,legend, ncol=2, nrow = 4)

figure_consgest

ggsave("figure4.tiff",figure_consgest,device="tiff",width=7,height=10,units= c("cm"), dpi=600)
```

Tabela suplementar 5 e figura 5

```
banco_n <- banco_n %>% rename(postpartum_intakeB1=adeqb1_cat_pp)

banco_n$postpartum_intakeB1<- factor(banco_n$postpartum_intakeB1, labels = c("Above","Below"))

table(banco_n$postpartum_intakeB1)


m1_b1_cons_pp<-
lmer(vitB1_HM~idade_bebe_lh*postpartum_intakeB1+imc_pre+suple_vitb_gest+vit_b1_totalgest+I(idad
e_bebe_lh^2)+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE)

summary(m1_b1_cons_pp)

cons_pp_b1g<-interact_plot(m1_b1_cons_pp,pred=idade_bebe_lh,modx=postpartum_intakeB1, data=
banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "Thiamin",line.thickness = 0.3,
x.label="Postpartum days")+ scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by
=20))+scale_y_continuous(breaks = seq(0,150, by =30))+ theme_classic()+ theme(legend.position =
"none")+ theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x =
element_text(color="#000000",  size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks =
```

```
element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ ggtitle("A")+ theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

cons_pp_b1g


banco_n <- banco_n %>% rename(postpartum_intakeB2=adeqb2_cat_pp)

banco_n$postpartum_intakeB2<- factor(banco_n$postpartum_intakeB2, labels = c("Above","Below"))

table(banco_n$postpartum_intakeB2)

m1_b2_cons_pp<-
lmer(B2_transf~idade_bebe_lh*postpartum_intakeB2+imc_pre+suple_vitb_gest+vit_b2_totalgest+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE)

summary(m1_b2_cons_pp)

cons_pp_b2g<-interact_plot(m1_b2_cons_pp,pred=idade_bebe_lh,modx=postpartum_intakeB2, data= banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "Riboflavin",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum days")+ scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+ scale_y_continuous(breaks = seq(0.05,0.12, by =0.010))+theme_classic()+ theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ggtitle("B")+theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

cons_pp_b2g


banco_n <- banco_n %>% rename(postpartum_intakeB3=adeqb3_cat_pp)

banco_n$postpartum_intakeB3<- factor(banco_n$postpartum_intakeB3, labels = c("Above","Below"))

table(banco_n$postpartum_intakeB3)

m1_b3_cons_pp<-
lmer(log(vitB3_HM)~idade_bebe_lh*postpartum_intakeB3+imc_pre+suple_vitb_gest+vit_b3_totalgest+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE)

summary(m1_b3_cons_pp)

cons_pp_b3g<-interact_plot(m1_b3_cons_pp,pred=idade_bebe_lh,modx=postpartum_intakeB3, data= banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "Niacin",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+scale_y_continuous(breaks = seq(5,8, by =0.45))+ theme_classic()+ theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ggtitle("C")+ theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

cons_pp_b3g
```

```
banco_n <- banco_n %>% rename(postpartum_intakeB5=adeqb5_cat_pp)

banco_n$postpartum_intakeB5<- factor(banco_n$postpartum_intakeB5, labels = c("Above","Below"))

table(banco_n$postpartum_intakeB5)

m1_b5_cons_pp<-
lmer(vitB5_HM~idade_bebe_lh*postpartum_intakeB5+imc_pre+suple_vitb_gest+vit_b5_totalgest+I(idad
e_bebe_lh^2)+I(idade_bebe_lh^3)+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id),
data=banco_n,REML=FALSE)

summary(m1_b5_cons_pp)

cons_pp_b5g<-interact_plot(m1_b5_cons_pp,pred=idade_bebe_lh,modx=postpartum_intakeB5, data=
banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "Pantothenic acid",line.thickness = 0.3,
x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+scale_y_continuous(breaks
= seq(0,2400, by =300))+theme_classic()+theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x =
element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000",
size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line
= element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ggtitle("D")+theme(plot.title =
element_text(size =5,hjust=0.5))

cons_pp_b5g


banco_n <- banco_n %>% rename(postpartum_intakeB6=adeqb6_cat_pp)

banco_n$postpartum_intakeB6<- factor(banco_n$postpartum_intakeB6, labels = c("Above","Below"))

table(banco_n$postpartum_intakeB6)

m1_b6_cons_pp<-
lmer(B6_transf~idade_bebe_lh*postpartum_intakeB6+imc_pre+suple_vitb_gest+vit_b6_totalgest+(1|reco
rd_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE)

summary(m1_b6_cons_pp)

cons_pp_b6g<-interact_plot(m1_b6_cons_pp,pred=idade_bebe_lh,modx=postpartum_intakeB6, data=
banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "B-6",line.thickness = 0.3,
x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+
scale_y_continuous(breaks = seq(0,16, by =1.8))+theme_classic()+theme(legend.position = "none")+
theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x =
element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks =
element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05,
"cm"))+ggtitle("E")+theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

cons_pp_b6g


banco_n <- banco_n %>% rename(postpartum_intakeB12=adeqb12_cat_pp)

banco_n$postpartum_intakeB12<- factor(banco_n$postpartum_intakeB12, labels = c("Above","Below"))

table(banco_n$postpartum_intakeB12)
```

```
m1_b12_cons_pp<-
lmer(B12_transf~idade_bebe_lh*postpartum_intakeB12+imc_pre+suple_vitb_gest+vit_b12_totalgest+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE)

summary(m1_b12_cons_pp)

cons_pp_b12g<-interact_plot(m1_b12_cons_pp,pred=idade_bebe_lh,modx=postpartum_intakeB12, data= banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "B-12",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+scale_y_continuous(breaks = seq(5,30, by =4))+ theme_classic()+ theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ggtitle("F")+ theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

cons_pp_b12g


banco_n <- banco_n %>% rename(postpartum_intakecholine=adeqcolina_cat_pp)

banco_n$postpartum_intakecholine<- factor(banco_n$postpartum_intakecholine, labels = c("Above","Below"))

table(banco_n$postpartum_intakecholine)

m1_choline_cons_pp<-
lmer(choline_HM~idade_bebe_lh*postpartum_intakecholine+imc_pre+suple_vitb_gest+colina_totalgest+I(idade_bebe_lh^2)+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n,REML=FALSE)

summary(m1_choline_cons_pp)

cons_pp_cholineg<-
interact_plot(m1_choline_cons_pp,pred=idade_bebe_lh,modx=postpartum_intakecholine, data= banco_n,colors=c("black","gray50"), interval = TRUE, y.label= "Choline",line.thickness = 0.3, x.label="Postpartum days")+scale_x_continuous(breaks = seq(0, 120, by =20))+scale_y_continuous(breaks = seq(0,200, by =18))+theme_classic()+ theme(legend.position = "none")+theme(axis.title.x = element_text( size =5),axis.title.y = element_text( size =5),axis.text.x = element_text(color="#000000", size =4),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =4), axis.ticks = element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+ggtitle("G")+ theme(plot.title = element_text(size =5,hjust=0.5))

cons_pp_cholineg

legend2 <- get_legend(cons_pp_cholineg2)


consumopp<-
grid.arrange(cons_pp_b1g,cons_pp_b2g,cons_pp_b3g,cons_pp_b5g,cons_pp_b6g,cons_pp_b12g,cons_pp_cholineg,legend2, ncol=2, nrow=4)

consumopp

ggsave("figure5.tiff",consumopp,device="tiff",width=7,height=10,units= c("cm"), dpi=600)
```

###Tabela suplementar 6

```
data10 <- as.data.frame(unclass(dados2))

banco_n2<-data10 %>%

  filter (id_micronutriente=="com amostra de LH")


banco_n2 <- banco_n2 %>% rename(Gestational_age=ga_parto_cat)

banco_n2$Gestational_age<- factor(banco_n2$Gestational_age, labels = c("37-39 weeks","40-42 weeks"))

table(banco_n2$Gestational_age)


m1_b1_ga<-
lmer(vitB1_HM~idade_bebe_lh*Gestational_age+imc_pre+paridade+I(idade_bebe_lh^2)+(1|record_id)+(
0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n2,REML=FALSE, control = lmerControl(optimizer =
"Nelder_Mead"))

summary(m1_b1_ga)


m1_b2_ga<-
lmer(B2_transf~idade_bebe_lh*Gestational_age+imc_pre+paridade+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|reco
rd_id), data=banco_n2,REML=FALSE)

summary(m1_b2_ga)


m1_b3_ga<-
lmer(log(vitB3_HM)~idade_bebe_lh*Gestational_age+imc_pre+paridade+(1|record_id)+(0+idade_bebe_l
h|record_id), data=banco_n2,REML=FALSE, control = lmerControl(optimizer = "Nelder_Mead"))

summary(m1_b3_ga)


m1_b5_ga<-
lmer(vitB5_HM~idade_bebe_lh*Gestational_age+imc_pre+paridade+I(idade_bebe_lh^2)+I(idade_bebe_l
h^3)+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n2,REML=FALSE, control =
lmerControl(optimizer = "Nelder_Mead"))

summary(m1_b5_ga)


m1_b6_ga<-
lmer(B6_transf~idade_bebe_lh*Gestational_age+imc_pre+paridade+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|reco
rd_id), data=banco_n2,REML=FALSE, control = lmerControl(optimizer = "Nelder_Mead"))

summary(m1_b6_ga)
```

```
m1_b12_ga<-
lmer(B12_transf~idade_bebe_lh*Gestational_age+imc_pre+paridade+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n2,REML=FALSE, control = lmerControl(optimizer = "Nelder_Mead"))

summary(m1_b12_ga)


m1_choline_ga<-
lmer(choline_HM~idade_bebe_lh*Gestational_age+imc_pre+paridade+I(idade_bebe_lh^2)+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n2,REML=FALSE,control = lmerControl(optimizer = "Nelder_Mead"))

summary(m1_choline_ga)
```

####**Tabela Suplementar 1** (realizado no STATA)

```
ranksum imc_pre if visitas==1, by(id_micronutriente)

ranksum idade_mae if visitas==1, by(id_micronutriente)

tab2 idade_mae2 id_micronutriente if visitas==1,chi2 exact

tab2 estudomae_cat id_micronutriente if visitas==1,chi2 exact

tab2 cor_autodeclarada id_micronutriente if visitas==1,chi2 exact

tab2 cat_new_imc_pre id_micronutriente if visitas==1,chi2 exact

tab2 paridade_cat id_micronutriente if visitas==1,chi2 exact

tab2 tipo_parto id_micronutriente if visitas==1,chi2 exact
```

####**Figura Suplementar 1** (realizado no R)

```
bancoate8d <-banco2 %>% filter(idade_bebe<=8)
box_plot_b1<- ggplot( bancoate8d, aes(x =idade_bebe, y =vitB1_HM, group =idade_bebe)) +
  geom_boxplot(width = .2, outlier.colour = NA, coef = 1000) +
  geom_boxplot(fill="lightgray")+
  scale_x_continuous(breaks = seq(2, 8, by = 1)) +
  scale_y_continuous(breaks = seq(0, 70, by = 10)) +
  geom_jitter(width = .05,alpha = .4,color = "orange")+
  labs(title="",x="Days", y = "B1 (µg/L)")+
  theme_classic()+ theme(
    panel.border = element_blank(),
```

```
  panel.grid.major = element_blank(),
  panel.grid.minor = element_blank(),
  axis.line = element_line(colour = "black"))

box_plot_b2<- ggplot( bancoate8d, aes(x =idade_bebe, y =vitB2_HM, group =idade_bebe)) +
  geom_boxplot(width = .2, outlier.colour = NA, coef = 1000) +
  geom_boxplot(fill="lightgray")+
  scale_x_continuous(breaks = seq(2, 8, by = 1)) +
  scale_y_continuous(breaks = seq(0, 1205, by = 100)) +
  geom_jitter(width = .05,alpha = .4,color = "orange")+
  labs(title="",x="Days", y = "B2 (µg/L)")+
  theme_classic()+ theme(
    panel.border = element_blank(),
    panel.grid.major = element_blank(),
    panel.grid.minor = element_blank(),
    axis.line = element_line(colour = "black"))

box_plot_b3<- ggplot( bancoate8d, aes(x =idade_bebe, y =vitB3_HM, group =idade_bebe)) +
  geom_boxplot(width = .2, outlier.colour = NA, coef = 1000) +
  geom_boxplot(fill="lightgray")+
  scale_x_continuous(breaks = seq(2, 8, by = 1)) +
  scale_y_continuous(breaks = seq(0, 3400, by = 400)) +
  geom_jitter(width = .05,alpha = .4,color = "orange")+
  labs(title="",x="Days", y = "B3 (µg/L)")+
  theme_classic()+ theme(
    panel.border = element_blank(),
    panel.grid.major = element_blank(),
    panel.grid.minor = element_blank(),
    axis.line = element_line(colour = "black"))
```

```
box_plot_b5<- ggplot( bancoate8d, aes(x =idade_bebe, y =vitB5_HM, group =idade_bebe)) +
  geom_boxplot(width = .2, outlier.colour = NA, coef = 1000) +
  geom_boxplot(fill="lightgray")+
  scale_x_continuous(breaks = seq(2, 8, by = 1)) +
  scale_y_continuous(breaks = seq(0, 3700, by = 400)) +
  geom_jitter(width = .05,alpha = .4,color = "orange")+
  labs(title="",x="Days", y = "B5 (µg/L)")+
  theme_classic()+ theme(
    panel.border = element_blank(),
    panel.grid.major = element_blank(),
    panel.grid.minor = element_blank(),
    axis.line = element_line(colour = "black"))

box_plot_b6<- ggplot( bancoate8d, aes(x =idade_bebe, y =vitB6_HM, group =idade_bebe)) +
  geom_boxplot(width = .2, outlier.colour = NA, coef = 1000) +
  geom_boxplot(fill="lightgray")+
  scale_x_continuous(breaks = seq(2, 8, by = 1)) +
  scale_y_continuous(breaks = seq(0, 82, by = 5)) +
  geom_jitter(width = .05,alpha = .4,color = "orange")+
  labs(title="",x="Days", y = "B6 (µg/L)")+
  theme_classic()+ theme(
    panel.border = element_blank(),
    panel.grid.major = element_blank(),
    panel.grid.minor = element_blank(),
    axis.line = element_line(colour = "black"))

box_plot_b12<- ggplot( bancoate8d, aes(x =idade_bebe, y =vitB12_HM, group =idade_bebe)) +
  geom_boxplot(width = .2, outlier.colour = NA, coef = 1000) +
  geom_boxplot(fill="lightgray")+
  scale_x_continuous(breaks = seq(2, 8, by = 1)) +
  scale_y_continuous(breaks = seq(0, 1125, by =100)) +
```

```
  geom_jitter(width = .05,alpha = .4,color = "orange")+
  labs(title="",x="Days", y = "B12 (pmol/L)")+
  theme_classic()+ theme(
    panel.border = element_blank(),
    panel.grid.major = element_blank(),
    panel.grid.minor = element_blank(),
    axis.line = element_line(colour = "black"))

box_plot_choline<- ggplot( bancoate8d, aes(x =idade_bebe, y =choline_HM, group =idade_bebe)) +
  geom_boxplot(width = .2, outlier.colour = NA, coef = 1000) +
  geom_boxplot(fill="lightgray")+
  scale_x_continuous(breaks = seq(2, 8, by = 1)) +
  scale_y_continuous(breaks = seq(0, 250, by =25)) +
  geom_jitter(width = .05,alpha = .4,color = "orange")+
  labs(title="",x="Days", y = "choline (mg/L)")+
  theme_classic()+ theme(
    panel.border = element_blank(),
    panel.grid.major = element_blank(),
    panel.grid.minor = element_blank(),
    axis.line = element_line(colour = "black"))
```

####**Figura Suplementar 2** (realizado no R)

```
corr <- round(cor(df_b[,1:35],method = "spearman", use = "pairwise.complete.obs"),2)
m1<-head(corr[1:14,15:35],15)

corr_2 <- round(cor(df_b2[,1:35],method = "spearman", use = "pairwise.complete.obs"),2)
m1_2<-head(corr_2[1:14,15:35],15)

colnames(m1) <- c("B1- TP1", "B2- TP1", "B3- TP1", "B5- TP1", "B6- TP1", "B12- TP1", "Choline- TP1","B1- TP2", "B2- TP2", "B3- TP2", "B5- TP2", "B6- TP2", "B12- TP2", "Choline- TP2","B1- TP3", "B2- TP3", "B3- TP3", "B5- TP3", "B6- TP3", "B12- TP3", "Choline- TP3")
```

```
rownames(m1) <- c("pre-pregnancy BMI", "BMI at TP1", "BMI at TP2", "BMI at TP3", "red meat-pregnancy", "chicken-pregnancy","fish-pregnancy","eggs-pregnancy","milk-pregnancy", "red meat-lactation","chicken-lactation", "fish-lactation", "eggs-lactation","milk-lactation")

corrplot(m1)


colnames(m1_2) <- c("B1 at TP1", "B2 at TP1", "B3 at TP1", "B5 at TP1", "B6 at TP1", "B12 at TP1", "Choline at TP1","B1 at TP2", "B2 at TP2", "B3 at TP2", "B5 at TP2", "B6 at TP2", "B12 at TP2", "Choline at TP2","B1 at TP3", "B2 at TP3", "B3 at TP3", "B5 at TP3", "B6 at TP3", "B12 at TP3", "Choline at TP3")

rownames(m1_2) <- c("red meat-lactation","chicken-lactation", "fish-lactation", "eggs-lactation","milk-lactation","red meat-pregnancy", "chicken-pregnancy","fish-pregnancy","eggs-pregnancy","milk-pregnancy","BMI at TP3", "BMI at TP2", "BMI at TP1","pre-pregnancy BMI")

corrplot(m1_2)


p.mat <- round(cor_pmat(df_b[,1:35],method = "spearman", use = "pairwise.complete.obs"),3)

p_m1<-head(p.mat[1:14,15:35],15)


ggcorrplot (m1, title = "",show.legend = TRUE,legend.title = " Spearman correlation coefficients", show.diag =T,ggtheme = ggplot2::theme_classic(), outline.color = "black", lab=TRUE, lab_col = "black", lab_size = 2.5, p.mat =p_m1, sig.level = 0.05, insig = c("blank"),hc.order=F, tl.cex=10, tl.col = "black",digits = 2)+ coord_flip()


p1<-ggcorrplot (m1_2, title = "",show.legend = TRUE,legend.title = " Spearman correlation coefficients", show.diag =T, method = "square", ggtheme = ggplot2::theme_minimal(),outline.color = "black", lab=F, sig.level = 0.05,insig = c("blank"),hc.order=F)+ coord_flip()


p1+font("xy.text", size = 12, color = "black", face = "bold")
```

####Figura Suplementar 3 (realizado no R)

```
b1_trajetoria<-
lmer(vitB1_HM~idade_bebe_lh+I(idade_bebe_lh^2)+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id),
data=banco_n)

summary(b1_trajetoria)

efeitob1_tempo <- effect("idade_bebe_lh",b1_trajetoria, partial.residuals=T)

gb1<-plot(efeitob1_tempo, ylab="B1", xlab="Postpartum days", colors=c("black","gray50"), main="Vitamin B1 ",axes =list(smooth=T,span=0.75,lty="dashed"))

gb1
```

```
b2_trajetoria<-lmer(vitB2_HM~idade_bebe_lh+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n)

summary(b2_trajetoria)

efeitob2_tempo <- effect("idade_bebe_lh",b2_trajetoria, partial.residuals=T)

gb2<-plot(efeitob2_tempo, ylab="B2", xlab="Postpartum day", colors=c("black","gray50"), main="Vitamin B2 ",axes =list(smooth=T,span=0.75,lty="dashed"))

gb2


b3_trajetoria<-
lmer(vitB3_HM~idade_bebe_lh+I(idade_bebe_lh^2)++I(idade_bebe_lh^3)+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n)

summary(b3_trajetoria)

efeitob3_tempo <- effect("idade_bebe_lh",b3_trajetoria, partial.residuals=T)

gb3<-plot(efeitob3_tempo, ylab="B3", xlab="Postpartum day", colors=c("black","gray50"), main="Vitamin B3 ",axes =list(smooth=T,span=0.75,lty="dashed"))

gb3


b5_trajetoria<-
lmer(vitB5_HM~idade_bebe_lh+I(idade_bebe_lh^2)++I(idade_bebe_lh^3)+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n)

summary(b5_trajetoria)

efeitob5_tempo <- effect("idade_bebe_lh",b5_trajetoria, partial.residuals=T)

gb5<-plot(efeitob5_tempo, ylab="B5", xlab="Postpartum day", colors=c("black","gray50"), main="Vitamin B5 ",axes =list(smooth=T,span=0.75,lty="dashed"))

gb5


b6_trajetoria<-lmer(vitB6_HM~idade_bebe_lh+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n)

summary(b6_trajetoria)

efeitob6_tempo <- effect("idade_bebe_lh",b6_trajetoria, partial.residuals=T)

gb6<-plot(efeitob6_tempo, ylab="B6", xlab="Postpartum day", colors=c("black","gray50"), main="Vitamin B6 ",axes =list(smooth=T,span=0.75,lty="dashed"))

gb6


b12_trajetoria<-lmer(vitB12_HM~idade_bebe_lh+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n)
```

```
summary(b12_trajetoria)

efeitob12_tempo <- effect("idade_bebe_lh",b12_trajetoria, partial.residuals=T)

gb12<-plot(efeitob12_tempo, ylab="B12", xlab="Postpartum day", colors=c("black","gray50"), main="Vitamin B12 ",axes =list(smooth=T,span=0.75,lty="dashed"))

gb12


choline_trajetoria<-
lmer(choline_HM~idade_bebe_lh+I(idade_bebe_lh^2)+(1|record_id)+(0+idade_bebe_lh|record_id), data=banco_n)

summary(choline_trajetoria)

efeitocholine_tempo <- effect("idade_bebe_lh",choline_trajetoria, partial.residuals=T)

gcholine<-plot(efeitocholine_tempo, ylab="choline", xlab="Postpartum day", colors=c("black","gray50"), main="choline ",axes =list(smooth=T,span=0.75,lty="dashed"))

gcholine

grid.arrange(gb1,gb2,gb3, gb5, gb6, gb12, gcholine, ncol=3)
```

ANEXO 7. Scripts das análises estatísticas-Artigo 2

Tabela 1 (realizado no Stata)

```
sum idade_mae if visitas==1 & status_new==1,d
sum anos_de_estudo if visitas==1 & status_new==1,d
tab situacao_conjugal if status_new==1 & visitas==1
tab paridade_cat if status_new==1 & visitas==1
tab cat_new_imc_pre if status_new==1 & visitas==1
tab vitbfolato_gest if status_new==1 & visitas==1
sum epds_escore_gest if visitas==1 & status_new==1,d
tab epdsgest_cat if status_new==1  & visitas==1
sum escore_final_idatee_gest if visitas==1 & status_new==1 ,d
tab idateestadogest_cat if status_new==1  & visitas==1
sum B12_sanguevisita2 if visitas==1 & status_new==1,d
tab  b12_gest_cat2 if status_new==1  & visitas==1
sum homocisteina2_visita2 if visitas==1 & status_new==1,d
tab homocisteina_v2_cat if status_new==1  & visitas==1
sum folato_visita2 if visitas==1 & status_new==1,d
tab folato_v2_cat if status_new==1  & visitas==1
sum B12_sanguevisita3 if visitas==3,d
sum homocisteina2_vista3 if visitas==3,d
sum B12_sanguevisita4 if visitas==4,d
sum homocisteina2_visita4 if visitas==4,d
sum vitB12_HM if status_new==1 & visitas==3,d
sum vitB12_HM if status_new==1 & visitas==4,d
tab vitB12_HM_cat if status_new==1  & visitas==3
tab vitB12_HM_cat if status_new==1  & visitas==4
tab tipo_aleitamentoo4o54 if status_new==1 & visitas==4 & vitB12_HM~=.
tab tipo_aleitamentoo4o53 if status_new==1 & visitas==3 & vitB12_HM~=.
```

Tabela 2 (realizado no Stata)

regress lnb12sangue_7d epds_escore_gest folato_visita2 B12_sanguevisita2 idade_mae situacao_conjugal estudo_cat imcpre_cat if visitas==3 & status==1

regress lnb12sangue_1m epds_escore_gest folato_visita2 B12_sanguevisita2 idade_mae situacao_conjugal estudo_cat imcpre_cat if visitas==3 & status==1

regress lnb12sangue_7d escore_final_idatee_gest folato_visita2 B12_sanguevisita2 idade_mae situacao_conjugal estudo_cat imcpre_cat if visitas==3 & status2==1

regress lnb12sangue_1m escore_final_idatee_gest folato_visita2 B12_sanguevisita2 idade_mae situacao_conjugal estudo_cat imcpre_cat if visitas==3 & status2==1

regress lnthcysangue7d epds_escore_gest B12_sanguevisita2 folato_visita2 homocisteina2_visita2 if visitas==1 & status2==1

regress lnthcysangue1m epds_escore_gest B12_sanguevisita2 folato_visita2 homocisteina2_visita2 if visitas==1 & status2==1

regress lnthcysangue7d escore_final_idatee_gest B12_sanguevisita2 folato_visita2 homocisteina2_visita2 if visitas==1 & status2==1

regress lnthcysangue1m escore_final_idatee_gest B12_sanguevisita2 folato_visita2 homocisteina2_visita2 if visitas==1 & status2==1

Tabela 3 (realizado no Stata)

regress lnb12_leite epds_escore_gest if visitas==3 & status2==1

regress lnb12_leite epds_escore_gest imcpre_cat homocisteina2_visita2 B12_sanguevisita2 if visitas==3 & status2==1

regress lnb12_leite epds_escore_gest imcpre_cat vitbfolato_gest b12_ajustadogest_c if visitas==3 & status2==1

regress lnb12_leite epds_escore_gest if visitas==4 & status2==1

regress lnb12_leite epds_escore_gest imcpre_cat homocisteina2_visita2 B12_sanguevisita2 if visitas==4 & status2==1

regress lnb12_leite epds_escore_gest imcpre_cat vitbfolato_gest b12_ajustadogest_c if visitas==4 & status2==1

```
regress lnb12_leite  escore_final_idatee_gest if visitas==3 & status2==1

regress lnb12_leite  escore_final_idatee_gest imcpre_cat homocisteina2_visita2 B12_sanguevisita2 if visitas==3 & status2==1

regress lnb12_leite  escore_final_idatee_gest imcpre_cat vitbfolato_gest b12_ajustadogest_c if visitas==3 & status2==1


regress lnb12_leite  escore_final_idatee_gest if visitas==4 & status2==1

regress lnb12_leite  escore_final_idatee_gest imcpre_cat homocisteina2_visita2 B12_sanguevisita2 if visitas==4 & status2==1

regress lnb12_leite  escore_final_idatee_gest imcpre_cat vitbfolato_gest b12_ajustadogest_c if visitas==4 & status2==1


regress lnb12_leite  epds_escore_1m if visitas==4 & status2==1

regress lnb12_leite  epds_escore_1m imcpre_cat  homocisteina2_visita4 B12_sanguevisita4 epdsgest_cat if visitas==4 & status2==1

regress lnb12_leite epds_escore_1m imcpre_cat vitbfolato_gest b12_ajustadogest_c epdsgest_cat if visitas==4 & status2==1


regress lnb12_leite  escore_final_idate_estado_1m if visitas==4 & status2==1

regress lnb12_leite  escore_final_idate_estado_1m imcpre_cat  homocisteina2_visita4 B12_sanguevisita4 idateestadogest_cat if visitas==4 & status2==1

regress lnb12_leite escore_final_idate_estado_1m imcpre_cat vitbfolato_gest b12_ajustadogest_c idateestadogest_cat if visitas==4 & status2==1
```

Figura 1 (realizada no R)

```
gb12epds_b12<-dadosb12 %>%
  filter(epdsgest_cat2 %in% c("No","Yes")) %>%
  filter(consulta %in% c("3","4")) %>%
  ggplot(aes(x=consulta, y=vitB12_HM, fill=factor(epdsgest_cat2))) +
  geom_boxplot(width=0.4, lwd=0.15, outlier.colour = "grey", outlier.size =0.5) +
  stat_compare_means( label = "p.signif", label.x = 1.5, label.y = 1000, size=3, hide.ns = TRUE)+
  theme_classic()+
  theme(legend.title = element_text(color = "black", size = 3),
```

```
      legend.text = element_text(color = "black", size = 3),legend.key.size = unit(0.1, "cm"),
legend.key.height = unit(0.1, 'cm'),
      legend.key.width = unit(0.1, 'cm'))+
  scale_fill_manual(values = c("#999999", "#FFFFFF"))+
  scale_x_discrete(labels = c('2-8 days','28-50 days'))+
  scale_y_continuous(breaks = seq(0,1500, by =200))+
  labs(x="Postpartum", y = "B-12 (pmol/L)")+
  theme(axis.title.x = element_text( size =3),axis.title.y = element_text( size =3),axis.text.x =
element_text(color="#000000",  size =3),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =3), axis.ticks
= element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+
  ggtitle("A")


g1<-gb12epds_b12+ labs(fill = "Depressive symptoms\nat baseline")+
  theme(plot.title = element_text(size =5,face="bold",hjust=0.5))+ theme(
    legend.position ="right")
g1


gb12stai_s_b12<-dadosb12 %>%
  filter(idateestadogest_cat2 %in% c("No","Yes")) %>%
  filter(consulta %in% c("3","4")) %>%
  ggplot(aes(x=consulta, y=vitB12_HM, fill=factor(idateestadogest_cat2))) +
  geom_boxplot(width=0.4, lwd=0.15, outlier.colour = "grey", outlier.size =0.5) +
  stat_compare_means( label = "p.signif", label.x = 1.5, label.y = 800, size=3, hide.ns = TRUE)+
  theme_classic()+
  theme(legend.title = element_text(color = "black", size = 3),
      legend.text = element_text(color = "black", size = 3),legend.key.size = unit(0.1, "cm"),
legend.key.height = unit(0.1, 'cm'),
      legend.key.width = unit(0.1, 'cm'))+
  scale_fill_manual(values = c("#999999", "#FFFFFF"))+
  scale_x_discrete(labels = c('2-8 days','28-50 days'))+
  scale_y_continuous(breaks = seq(0,1500, by =200))+
  labs(x="Postpartum", y = "B-12 (pmol/L)")+
```

```
  theme(axis.title.x = element_text( size =3),axis.title.y = element_text( size =3),axis.text.x =
element_text(color="#000000",  size =3),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =3), axis.ticks
= element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+
  ggtitle("B")


g2<-gb12stai_s_b12+ labs(fill = "Anxiety symptoms\nat baseline")+
  theme(plot.title = element_text(size =5,face="bold",hjust=0.5))+ theme(
    legend.position ="right")
g2


gb12epds1m_b12<-dadosb12 %>%
  filter(epds1m_cat2 %in% c("No","Yes")) %>%
  filter(consulta %in% c("4")) %>%
  ggplot(aes(x=consulta, y=vitB12_HM, fill=factor(epds1m_cat2))) +
  geom_boxplot(width=0.4, lwd=0.15, outlier.colour = "grey", outlier.size =0.5) +
  stat_compare_means( label = "p.signif", label.x = 1.5, label.y = 1000, size=3, hide.ns = TRUE)+
  theme_classic()+
  theme(legend.title = element_text(color = "black", size = 3),
        legend.text = element_text(color = "black", size = 3),legend.key.size = unit(0.1, "cm"),
legend.key.height = unit(0.1, 'cm'),
        legend.key.width = unit(0.1, 'cm'))+
  scale_fill_manual(values = c("#999999", "#FFFFFF"))+
  scale_x_discrete(labels = c('28-50 days'))+
  scale_y_continuous(breaks = seq(0,1500, by =200))+
  labs(x="Postpartum", y = "B-12 (pmol/L)")+
  theme(axis.title.x = element_text( size =3),axis.title.y = element_text( size =3),axis.text.x =
element_text(color="#000000",  size =3),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =3), axis.ticks
= element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+
  ggtitle("C")
```

```
g3<-gb12epds1m_b12+ labs(fill = "Depressive symptoms\nat TP2")+
  theme(plot.title = element_text(size =5,face="bold",hjust=0.5))+ theme(
    legend.position ="right")
g3


gb12stai1m_s_b12<-dadosb12 %>%
  filter(idateestado1m_cat2 %in% c("No","Yes")) %>%
  filter(consulta %in% c("4")) %>%
  ggplot(aes(x=consulta, y=vitB12_HM, fill=factor(idateestado1m_cat2))) +
  geom_boxplot(width=0.4, lwd=0.15, outlier.colour = "grey", outlier.size =0.5) +
  stat_compare_means( label = "p.signif", label.x = 1.5, label.y = 800, size=3, hide.ns = TRUE)+
  theme_classic()+
  theme(legend.title = element_text(color = "black", size = 3),
        legend.text = element_text(color = "black", size = 3),legend.key.size = unit(0.1, "cm"),
legend.key.height = unit(0.1, 'cm'),
        legend.key.width = unit(0.1, 'cm'))+
  scale_fill_manual(values = c("#999999", "#FFFFFF"))+
  scale_x_discrete(labels = c('28-50 days'))+
  scale_y_continuous(breaks = seq(0,1500, by =200))+
  labs(x="Postpartum", y = "B-12 (pmol/L)")+
  theme(axis.title.x = element_text( size =3),axis.title.y = element_text( size =3),axis.text.x =
element_text(color="#000000",  size =3),axis.text.y = element_text(color="#000000", size =3), axis.ticks
= element_line(size =0.1),axis.line = element_line(size = 0.2), axis.ticks.length = unit(0.05, "cm"))+
  ggtitle("D")


g4<-gb12stai1m_s_b12+ labs(fill = "Anxiety symptoms \nat TP2")+
  theme(plot.title = element_text(size =5,face="bold",hjust=0.5))+ theme(
    legend.position ="right")
g4


figure1<-ggarrange(g1, g2, g3, g4, nrow =4, ncol=1)
figure1
```

Tabela Suplementar 1 (realizado no Stata)

```
sort status
by  status: sum B12_sanguevisita2 if visitas==1,d
ranksum B12_sanguevisita2 if visitas==1, by(status)

sort status
by status: sum homocisteina2_visita2 if visitas==1,d
ranksum homocisteina2_visita2 if visitas==1, by(status)

tab2 idademae_cat status  if visitas==1, chi2 exact row
tab2 estudo_cat status  if visitas==1, chi2 exact row
tab2 B12_sanguevisita2_cat status  if visitas==1, chi2 exact row
tab2 vitbfolato_gest status  if visitas==1, chi2 exact row
tab2 epdsgest_cat status if visitas==1, chi2 exact row
tab2 idateestadogest_cat status if visitas==1, chi2 exact row
```

Tabela Suplementar 2 (realizado no Stata)

```
regress  epds_escore_1m  B12_sanguevisita2 folato_visita2 idade_mae estudo_cat situacao_conjugal imcpre_cat epdsgest_cat if visitas==1 & status_new==1
regress  escore_final_idate_estado_1m  B12_sanguevisita2 folato_visita2 idade_mae estudo_cat situacao_conjugal imcpre_cat idateestadogest_cat if visitas==1 & status_new==1

regress  epds_escore_1m  homocisteina2_visita2 B12_sanguevisita2 folato_visita2 epdsgest_cat if visitas==1 & status_new==1
regress  escore_final_idate_estado_1m homocisteina2_visita2  B12_sanguevisita2 folato_visita2 idateestadogest_cat if visitas==1 & status_new==1
```

Tabela Suplementar 3 (realizado no Stata)

```
sort epdsgest_cat
by epdsgest_cat: sum vitB12_HM if visitas==3,d
ranksum vitB12_HM if visitas==3, by(epdsgest_cat)
```

```
sort epdsgest_cat
by epdsgest_cat: sum vitB12_HM if visitas==4,d
ranksum vitB12_HM if visitas==4, by(epdsgest_cat)

sort idateestadogest_cat
by idateestadogest_cat: sum vitB12_HM if visitas==3,d
ranksum vitB12_HM if visitas==3, by(idateestadogest_cat)

sort idateestadogest_cat
by idateestadogest_cat: sum vitB12_HM if visitas==4,d
ranksum vitB12_HM if visitas==4, by(idateestadogest_cat)

sort epds1m_cat
by epds1m_cat: sum vitB12_HM if visitas==4,d
ranksum vitB12_HM if visitas==4, by(epds1m_cat)

sort idateestado1m_cat
by idateestado1m_cat: sum vitB12_HM if visitas==4,d
ranksum vitB12_HM if visitas==4, by(idateestado1m_cat)
```