

**Associação entre as concentrações e a diversidade de oligossacarídeos
do leite humano e o desenvolvimento infantil até 12 meses de vida da
criança**

Ana Lorena Lima Ferreira

Rio de Janeiro

2020

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde

Instituto de Nutrição Josué de Castro

**Associação entre as concentrações e a diversidade de oligossacarídeos do leite humano e
o desenvolvimento infantil até 12 meses de vida da criança**

Ana Lorena Lima Ferreira

Tese apresentada à banca examinadora e ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Nutricionais.

Orientador: Professor Dr. Gilberto Kac

Rio de Janeiro

Fevereiro, 2020

CIP - Catalogação na Publicação

FF383a Ferreira, Ana Lorena Lima
Associação entre as concentrações e a diversidade
de oligossacarídeos do leite humano e o
desenvolvimento infantil até 12 meses de vida da
criança / Ana Lorena Lima Ferreira. -- Rio de
Janeiro, 2020.
197 f.

Orientador: Gilberto Kac.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro,
Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2020.

1. Aleitamento materno. 2. Leite humano. 3.
Oligossacarídeos. 4. Análise de sobrevida. 5.
Desenvolvimento infantil. I. Kac, Gilberto, orient.
II. Título.

**Associação entre as concentrações e a diversidade de oligossacarídeos do leite humano e
o desenvolvimento infantil até 12 meses de vida da criança**

Ana Lorena Lima Ferreira

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. Cláudia Regina Lindgren Alves
Faculdade de Medicina/Universidade Federal de Minas Gerais

Professor Dr. Carlos Adam Conte Junior
Instituto de Química/Universidade Federal do Rio de Janeiro

Professor Dr. Jesus Landeira-Fernandez
Departamento de Psicologia/Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Professora Dra. Maria Beatriz Trindade de Castro
Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro

Professora Dra. Tatiana El-Bacha Porto
Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro – **Revisora**

Professor Dr. Gilberto Kac
Instituto de Nutrição Josué de Castro/Universidade Federal do Rio de Janeiro – **Orientador**

Dedicatória

Dedico este trabalho a todas as mulheres da minha história, minha mãe Ana Lúcia, avós e tias que lutaram para que hoje eu estivesse aqui; ao meu pai José Luiz e meus irmãos André e Luiz que me incentivaram desde o começo da caminhada e meu companheiro Wellington que acompanhou de perto e com muito amor nessa jornada e esteve ao meu lado em todos os momentos.

Agradecimentos

Agradeço a Deus e a todas as energias e forças que acredito e que me guiaram até este momento. Agradeço aos meus queridos pais, Ana Lúcia e José Luiz, por terem batalhado para que eu e meus irmãos estudássemos e crescesssemos, e se hoje estou aqui é graças ao esforço incansável deles. Sou privilegiada por ter tido essa oportunidade. Agradeço aos meus irmãos André e Luiz que sempre me fortaleceram e acreditaram em mim! Sem o apoio deles seria difícil conseguir!

Agradeço ao meu esposo e companheiro de vida, Wellington, que desde sempre me incentivou, e nos momentos mais difíceis dessa e de tantas outras caminhadas esteve ao meu lado. Obrigada por embarcar nesse sonho comigo. Agradeço a minhas avós Helena e Lúcia (*in memorian*) pois apesar de não as ter conhecido em vida, me inspirei diariamente em suas histórias de muita luta. Agradeço ao meu avô Francisco Amador (*in memorian*) que acompanhou o começo de minha jornada e me ensinou lições que trago até hoje. Agradeço a minha tia-avó Benedita (*in memorian*) que sempre foi luz na minha vida. Agradeço a todas as minhas tias Ana Cristina, Nazaré, Mariluci, Vera e Silvia, por todo incentivo e apoio, em especial tia Lúcia, por ter me acolhido como filha no Rio de Janeiro. Agradeço, enfim a todos os meus familiares.

Agradeço a Carla, amiga irmã que a Nutrição me apresentou e com quem dividi o lar e a vida nesses quatro anos tão desafiadores, obrigada pelo colo, amor e afeto diáários. Agradeço a Camila Aranha e Saulinho, amigos que sempre ajudaram e torceram e com quem dividi momentos maravilhosos! Agradeço a amiga Leiliane por mesmo de longe se fazer presente. Agradeço aos primeiros amigos da vida e que até hoje se eternizam na minha história e torcem por mim, Naicha, Michel, Carolina, Aynara, Jhuly e Josilene. Agradeço aos amigos Evelin, Cleyton, Suzete e Frances pelo amor e carinho fortalecedores. Agradeço a Adriana, amiga desde os tempos da Educação Física, pelo apoio incondicional. Agradeço a todos os amigos que torceram e emanaram amor para que essa caminhada se concluisse.

Agradeço às amigas Nadyta e Moniquinha, “retirantes” que se fizeram imprescindíveis nessa jornada, caminhando ao meu lado e segurando minha mão diversas vezes! Obrigada por toda a ajuda e afeto que tornaram o caminho mais leve! Agradeço a Lissandra, amiga-irmã soteropolitana que reencontrei, e foi um grato presente desse doutorado para vida! Agradeço a Camila, minha companheira de doutorado, e amiga com quem dividi desde as disciplinas até os perrengues e conquistas! Agradeço a Nathalia (filha do coração), Amandinha, Luciana e Anna Carolina, companheiras do “Projeto Microbiota”, sem às quais não teríamos chegado ao dia de

hoje e que tornaram a caminhada diária repleta de carinho e força. Agradeço também aqueles que passaram pelo Projeto e muito contribuíram como Érica e Dayana e tantos outros. Agradeço a todos os colegas que são ou passaram pelo Observatório de Epidemiologia Nutricional como Thais, Ronaldo, Paula Normando, Paula Cocate, Maiara, Pedro e todos os demais, por toda parceria e aprendizado diáários. Agradeço a querida Ana Beatriz, hoje Professora Ana Beatriz, que lá no começo, nem sequer me conhecia e foi incansável nas contribuições para o projeto de seleção do doutorado e seguiu me auxiliando em diversos momentos.

Agradeço a Professora e amiga Naiza Sá, por ter acreditado em mim e ter me incentivado. Se hoje estou aqui devo a sua força, amor e carinho e ao seu jeito inspirador de lecionar. Agradeço ao Professor e orientador Gilberto Kac por todos os aprendizados e oportunidades. Agradeço a Professora Tatiana El-Bacha por dispor de seu tempo e ter aceitado ser revisora desta tese e aos Professores Cláudia Lindgreen, Landeira, Carlos e Maria Beatriz por terem aceitado participar de minha banca de defesa e por contribuir com meu trabalho.

Agradeço a todas as participantes do “Projeto Microbiota” e seus filhos com os quais aprendi as maiores lições desse doutorado e sem os quais nada disso seria possível. Agradeço a toda esquipe da Clínica da Família Assis Valente. Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Nutrição por mesmo em tempos tão difíceis seguirem resistindo e fazendo ciência em nosso país. Agradeço a todos os funcionários do Instituto de Nutrição Josué de Castro.

Sou fruto da educação superior pública e de qualidade e acredito que somente por meio dela é possível gerar oportunidades! Agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa jornada iniciada na Universidade do Estado do Pará e na Universidade Federal do Pará e a todos os docentes e pesquisadores que hoje resistem bravamente e produzem ciência no Brasil!

Ana Lorena Lima Ferreira

Epígrafe

“Costumava observar minha avó, uma mulher brilhante, e ficava imaginando o que ela poderia ter sido se durante a juventude tivesse tido as mesmas oportunidades que os homens”.

“Precisamos encorajar mais mulheres a se atreverem a mudar o mundo”.

Chimamanda Ngozi Adichie

Lista de Quadros

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Ações de promoção e proteção do aleitamento materno no Brasil. | 31 |
| Quadro 2. Classificação do leite humano de acordo com o tempo pós-parto. | 34 |
| Quadro 3. Principais compostos bioativos do leite humano | 36 |
| Quadro 4. Estratégia de busca bibliográfica. | 45 |
| Quadro 5. Classificação dos índices antropométricos em crianças menores de 5 anos. | 55 |
| Quadro 6. Pontos de corte do <i>Age & Stages Questionnaires</i> (AQS-3/crianças americanas). | 60 |
| Quadro 7. Recomendações de ganho de peso total e por trimestre gestacional. | 62 |

Lista de Tabelas

Artigo 1

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Perfil demográfico e antropométrico e uso de suplementos de mulheres acompanhadas em uma coorte brasileira, Rio de Janeiro - <i>Demographic and anthropometric profile and supplement use of women from the Brazilian cohort, Rio de Janeiro, Brazil</i> | 76 |
| Tabela 2. Variação temporal das concentrações totais de oligossacarídeos do leite humano de acordo com o status secretor de mulheres acompanhadas em uma coorte brasileira, Rio de Janeiro, Brasil (n = 101) – <i>Time variation of human milk oligosaccharides (HMOs) concentrations in all women in the Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil (n = 101)</i> | 77 |
| Tabela 3. Variação temporal nas concentrações dos grupos de oligossacarídeos do leite humano de mulheres acompanhadas em uma coorte brasileira, Rio de Janeiro, Brasil (n = 101) – <i>Time variations in HMO group concentrations in women from the Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil (n = 101)</i> | 78 |
| Tabela 4. Variação nos índices de diversidade e uniformida de oligossacarídeos do leite humano entre mulheres acompanhadas em uma coorte brasileira, Rio de Janeiro, Brasil – <i>Variation in HMO diversity and evenness indexes among women from Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil</i> | 84 |
| Tabela 5. Escores de fatoração matricial não negativa descritos de acordo com o período pós-parto e geral (para todos os tempos) para os oligossacarídeos do leite humano – <i>NMF scores according to time postpartum period and general (for all times) for individual HMOs</i> | 85 |
| Tabela 6. Escores de fatoração matricial não negativa descritos de acordo com os quartis de idade materna para os oligossacarídeos do leite humano – <i>NMF scores according to maternal age quartiles for individual HMOs</i> | 86 |
| Tabela 7. Escores de fatoração matricial não negativa descritos de acordo com o IMC pré-gestacional materno para o oligossacarídeos do leite humano – <i>NMF scores according to pre-pregnancy BMI for individual HMOs</i> | 87 |

| | |
|---|----|
| Tabela 8. Escores de fatoração matricial não negativa descritos de acordo com a paridade para os oligossacarídeos do leite humano – <i>NMF scores according to parity for individual HMOs</i> | 88 |
|---|----|

| | |
|---|--|
| Tabela suplementar 1. Variação temporal das concentrações de oligossacarídeos do leite humano no total de acordo com o status secretor das mulheres acompanhadas na coorte brasileira, Rio de Janeiro, Brasil (n= 101) – <i>Time variation of HMOs concentrations according to Secretor status of women followed on Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil (n=101)</i> ...94 | |
|---|--|

Artigo 2

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Perfil antropométrico e demográfico de mulheres de uma coorte brasileira com e sem amostra de leite e ao longo do período de acompanhamento – <i>Demographic and anthropometric profile of women on Brazilian cohort with and without milk samples and throughout the follow-up period. Rio de Janeiro, Brazil</i> | 115 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| Tabela 2. Perfil ao nascimento e com um seis e doze meses das crianças acompanhadas na coorte brasileira – <i>Profile at birth and one, six, and 12 months of children followed in a Brazilian cohort</i> | 116 |
|---|-----|

| | |
|--|-----|
| Tabela 3. A razão de risco de subdistribuição da função de incidência cumulativa (modelos Fine e Gray de risco competitivo) – <i>The subdistribution hazard ratio (SHR) of cumulative incidence function (competing risk Fine & Gray models)</i> | 117 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Tabela suplementar 1. Modelos de regressão de Cox univariados de associações entre concentrações e α-diversidade de oligossacarídeos do leite humano com desenvolvimento infantil longitudinal – <i>Univariate Cox Regression models of associations between human milk oligosaccharides concentration and alpha diversity with longitudinal infant development..</i> | 127 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Tabela suplementar 2. Modelos de regressão de Cox multivariados de associações entre concentrações e α-diversidade de oligossacarídeos do leite humano com desenvolvimento infantil longitudinal – <i>Multivariate Cox Regression models of associations between human milk oligosaccharides concentration and alpha diversity with longitudinal infant development..</i> | 129 |
|--|-----|

Tabela suplementar 3. Modelos de regressão de Cox univariados de associações entre concentrações e α -diversidade de oligossacarídeos do leite humano de mães secretoras com desenvolvimento infantil longitudinal – *Univariate Cox Regression models of associations between human milk oligosaccharides concentrations and alpha diversity of secretor mothers with longitudinal infant development.* 131

Tabela suplementar 4. Modelos de regressão de Cox multivariados de associações entre concentrações e α -diversidade de oligossacarídeos do leite humano de mães secretoras com desenvolvimento infantil longitudinal – *Multivariate Cox Regression models of associations between human milk oligosaccharides concentration and alpha diversity of secretor mothers with longitudinal infant development.* 133

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Tendência temporal de indicadores de aleitamento materno de 1986 a 2013 no Brasil de acordo com pesquisas nacionais | 33 |
| Figura 2. Papel dos fatores de crescimento neural, do endotélio vascular, do hepatócito, epidérmico e semelhante a insulina no desenvolvimento de diversos tecidos e órgãos da criança..... | 38 |
| Figura 3. Composição e estrutura geral dos oligossacarídeos do leite humano | 38 |
| Figura 4. Fucosilação dos oligossacarídeos do leite humano, expressão dos genes secretor e de Lewis e das enzimas Fucosiltransferase 2 (FUT 2) e Fucosiltransferase 3 (FUT 3) na determinação da estrutura e complexidade dos OLH..... | 40 |
| Figura 5. Fluxograma do estudo com os procedimentos e avaliações realizados na linha de base e a cada seguimento..... | 53 |
| Figura 6. Etapas do procedimento da coleta e processamento das amostras de leite humano. | 57 |
| Figura 7. Definições da estrutura do <i>Age & Stages Questionnaires (ASQ-BR)</i> | 60 |
| Figura 8. Classificação e definição dos tipos de aleitamento materno..... | 64 |

Artigo 1

| | |
|--|----|
| Figura 1. Fluxo de mulheres e amostras leite humano de uma coorte brasileira – <i>Flow of women and human milk samples of the Brazilian cohort, totaling 101 women with 174 milk samples.</i> | 75 |
| Figura 2. Abundância absoluta e relativa de oligossacarídeos do leite humno de mulheres de uma coorte brasileira – <i>HMO absolute and relative abundance of women from the Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil.</i> | 79 |
| Figura 3. Box plot com as concetrações de oligossacarídeos do leite humano de melhores secretoras e não secretoras de uma coorte brasileira – <i>Box plot of secretor and non-secretor HMOs concentration of women from Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil.</i> | 80 |

Figura 4. Correlação de spearman entre variáveis demográficas, antropométricas e reprodutivas maternas e as concentrações individuais de oligossacarídeos do leite humano em mmol/L e diversidade e uniformidade em 2 a 8 dias – *Spearman rank correlations between maternal demographic, anthropometric, reproductive and supplementary variables and individual HMO concentration in mmol/L and diversity and evenness at 2–8 days*.....81

Figura 5. Correlação de spearman entre variáveis demográficas, antropométricas e reprodutivas maternas e as concentrações individuais de oligossacarídeos do leite humano em mmol/L e diversidade e uniformidade em 28 a 50 dias – *Spearman rank correlations between maternal demographic, anthropometric, reproductive and supplementary variables and individual HMO concentration in mmol/L and diversity and evenness at 28–50 days*.....82

Figura 6. Correlação de spearman entre variáveis demográficas, antropométricas e reprodutivas maternas e as concentrações individuais de oligossacarídeos do leite humano em mmol/L e diversidade e uniformidade em 88 a 119 dias – *Spearman rank correlations between maternal demographic, anthropometric, reproductive and supplementary variables and individual HMO concentration in mmol/L and diversity and evenness at 88–119 days*.....83

Artigo 2

Figura 1. Fluxo de mulheres, amostras de leite humano e crianças de uma coorte brasileira, totalizando 74 mulheres com amostras de leite de 28 a 50 dias pós-parto – *The flow of women milk samples and infants of the Brazilian cohort study, totaling 74 women with milk samples at 28–50 days postpartum*118

Figura 2. Modelo teórico do estudo com gráfico acíclico direcionado para mínimos ajustes – *Study' theoretical model with a Directed Acyclic Graph (DAG) for minimal adjustment*....119

Figura 3. Curvas de Kaplan-Meier com a proporção cumulativa das crianças estarem com desenvolvimento adequado durante o acompanhamento para A: Comunicação, B: Coordenação motoras grossas, C: Coordenação motoras finas, D: Resolução de problemas, E: Pessoal-social F: 2 ou > domínios.– *Kaplan-Meier curves for a cumulative proportion of infants with adequate development during the follow-up at A: Communication, B: Gross motor skills, C: Fine motor skills, D: Problem-solving, E: Personal-social F: 2 or > domains*120

Figura 4. Box plot das concentrações e α- diversidade de oligossacarídeos do leite humano estratificadas de acordo com a adequação do desenvolvimento infantil em um, seis e doze meses – *Box plot of human milk oligosaccharides concentration and alpha diversity stratified according to infant development adequacy at one month, six months, and twelve months.* ..121

Figura 5. Mapas de calor das razões de risco de regressão cox entre as concentrações de oligossacarídeos e α- diversidade do leite humano e os domínios de desenvolvimento infantil longitudinal com base em *Age & Stages Questionnaires* (ASQ-BR) – *Heatmaps of cox regression hazard ratios between human milk oligosaccharides (HMO) concentrations and alpha diversity and longitudinal infant development domains based on Age & Stages Questionnaires (ASQ-BR)*.....122

Figura 6. Mapas de calor de mulheres secretoras das razões de risco de regressão cox entre as concentrações de oligossacarídeos e α- diversidade do leite humano e os domínios de desenvolvimento infantil longitudinal com base em *Age & Stages Questionnaires* (ASQ-BR) – *Secretor women heatmaps of cox regression hazard ratios between human milk oligosaccharides (HMO) concentrations and alpha diversity and longitudinal infant development domains based on Age & Stages Questionnaires (ASQ-BR)*.....123

Figura suplementar 1. Box plot da concentração e α- diversidade de oligossacarídeos do leite humano estratificados por desenvolvimento infantil com 1 mês – *Box plot of human milk oligosaccharides concentration and alpha diversity indexes stratified per infant development at one-month.*124

Figura suplementar 2. Box plot da concentração e α- diversidade de oligossacarídeos do leite humano estratificados por desenvolvimento infantil com 6 meses – *Box plot of human milk oligosaccharides concentration and alpha diversity indexes stratified per infant development at 6 months.*125

Figura suplementar 3. Box plot da concentração e α- diversidade de oligossacarídeos do leite humano estratificados por desenvolvimento infantil com 12 meses – *Box plot of human milk oligosaccharides concentration and alpha diversity indexes stratified per infant development at 12 months.*126

Lista de Anexos

| | |
|--|-----|
| Anexo 1. Questionários | 156 |
| Anexo 2. Protocolo de Coleta de Leite Humano..... | 156 |
| Anexo 3. Parecer consubstanciado do Comitê de ética em pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e defesa civil do Rio de Janeiro | 157 |
| Anexo 4. Parecer Conssubstanciado do Comitê de ética em pesquisa da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro | 162 |
| Anexo 5. Termo de consentimento livre e esclarecido para participar da pesquisa..... | 165 |
| Anexo 6. Sintaxes das análises estatísticas – Artigo 1 | 167 |
| Anexo 7. Sintaxes das análises estatísticas – Artigo 2 | 190 |

Lista de Siglas e Abreviaturas

| | |
|--------|---|
| 2'FL | 2'-fucosyllactose |
| 3FL | 3-fucosyllactose |
| 3'SL | 3'-sialyllactose |
| 6'SL | 6'-sialyllactose |
| AA | Ácido Araquidônico |
| AAL | Ácido alfa linoleico |
| ABNT | Associação Brasileira de Normas Técnicas |
| AG | Ácido Graxo |
| AGPI | Ácido Graxo Poliinsaturado |
| AL | Ácido linoleico |
| AM | Aleitamento Materno |
| AME | Aleitamento Materno Exclusivo |
| AS | Ácido Siálico |
| ASQ | <i>Age and Stages Questionnaire</i> |
| BMI | <i>Body Mass Index</i> |
| CI | Crescimento infantil |
| CNPq | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| DCNT | Doença Crônica Não Transmissível |
| DFLac | Difucosyllactose |
| DFLNH | Difucosyllacto-N-hexaose |
| DFLNT | Difucosyllacto-N-tetrose |
| DHA | Ácido Docosa-Hexaenóico |
| DI | Desenvolvimento Infantil |
| DSLNH | Disialyllacto-N-hexaose |
| DSLNT | Disialyllacto-N-tetraose |
| DT | Doenças Transmissíveis |
| DUM | Data da Última Menstruação |
| EGF | <i>Epidermal Growth Factor</i> |
| FAPERJ | Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do RJ |
| FC | Fator de crescimento |
| FDSLNH | Fucodisialyllacto-N-hexaose |

| | |
|---------|---|
| FLNH | Fucosyllacto-N-hexaose |
| Fuc | <i>Human milk oligosaccharides-bound fucose</i> |
| FUT | Fucosiltransferase |
| HB | Hemoglobina |
| HB-EGF | <i>Heparin-binding Growth Factor</i> |
| HMO | <i>Human milk oligosaccharides</i> |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| Ig | Imunoglobulina |
| IGF | <i>Insulin-like Growth Factor</i> |
| IL | Interleucina |
| IMC | Índice de Massa Corporal |
| INJC | Instituto de Nutrição Josué de Castro |
| IOM | <i>Institute of Medicine</i> |
| IQ | <i>Intelligence Quotient</i> |
| LH | Leite Humano |
| LNFP | Lacto-N-fucopentaose |
| LNH | Lacto-N-hexaose |
| LNnT | Lacto-N-neotetraose |
| LNT | Lacto-N-tetrose |
| LST | sialyl-lacto-N-tetraose, |
| MS | Ministério da Saúde |
| NBR | Norma Brasileira de Regulamentação |
| NGF | <i>Nerve Growth Factor</i> |
| OLH | Oligossacarídeos do Leite Humano |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PNDS | Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde |
| PNIAM | Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno |
| PNS | Pesquisa Nacional de Saúde |
| PNSMIPF | Pesquisa Nacional de Saúde Materno Infantil e Planejamento familiar |
| RBLH | Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano |
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |
| REDCap | <i>Research Electronic Data Capture</i> |
| RSL | Revisão sistemática da literatura |

| | |
|--------|--|
| SG | Semana Gestacional |
| Sai | <i>Human milk oligosaccharides-bound sialic acid</i> |
| SMS/RJ | Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro |
| SNPs | <i>Singles nucleotide polymorphisms</i> |
| TGF | <i>Transforming Growth Factor</i> |
| TOTG | Teste oral de Tolerância à Glicose |
| UFRJ | Universidade Federal do Rio de Janeiro |
| UNICEF | <i>United Nations Children's Emergency Fund</i> |
| VEGF | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| APRESENTAÇÃO | 21 |
| RESUMO | 23 |
| ABSTRACT | 25 |
| 1 INTRODUÇÃO | 27 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 29 |
| 2.1 Definição de aleitamento materno | 29 |
| 2.2 Perspectivas históricas e recomendações para o aleitamento materno | 29 |
| 2.3 Classificação do aleitamento materno e efeitos na saúde materna e infantil | 30 |
| 2.4 Prevalência do aleitamento materno | 32 |
| 2.5 Composição e classificação do leite humano | 34 |
| 2.6 Compostos bioativos do leite humano e efeitos na saúde infantil | 35 |
| 2.7 Oligossacarídeos do leite humano (OLH) | 37 |
| 2.8 Fatores associados as concentrações de oligossacarídeos do leite humano (OLH) | 39 |
| 2.9 Associação dos oligossacarídeos do leite humano com a saúde infantil | 41 |
| 2.10 Crescimento e desenvolvimento infantil | 42 |
| 2.11 Fatores sociodemográfico e clínicos associados ao desenvolvimento infantil | 44 |
| 2.12 Oligossacarídeos do leite humano e desenvolvimento infantil | 44 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 47 |
| 4 OBJETIVOS | 49 |
| 4.1 Objetivo geral | 49 |
| 4.2 Objetivos específicos | 49 |
| 5 HIPÓTESES | 50 |
| 6 MÉTODOS | 51 |
| 6.1 Desenho do estudo | 51 |
| 6.2 Participantes | 51 |
| 6.2.1 Amostra e critérios de elegibilidade | 51 |
| 6.2.2 Critérios de exclusão | 51 |
| 6.2.3 Recrutamento | 54 |
| 6.3 Local do estudo | 54 |
| 6.4 Procedimentos de coleta de dados e amostras biológicas | 54 |
| 6.4.1 Coleta e entrada de dados | 54 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 6.4.2 | Antropometria infantil | 55 |
| 6.4.3 | Procedimento de coleta de leite humano | 56 |
| 6.4.4 | Análise de oligossacarídeos do leite humano | 58 |
| 6.4.5 | Desenvolvimento infantil | 59 |
| 6.4.6 | Covariáveis | 61 |
| 6.5 | Procedimentos de controle de qualidade dos dados | 63 |
| 6.5.1 | Treinamento dos entrevistadores | 63 |
| 6.5.2 | Estudo piloto | 65 |
| 6.5.3 | Revisão e envio dos questionários | 65 |
| 6.6 | Análise estatística | 65 |
| 6.6.1 | <i>Artigo 1 - Human milk oligosaccharide profile variation throughout postpartum in healthy women in a brazilian cohort.</i> | 66 |
| 6.6.2 | <i>Artigo 2 - Associations between human milk oligosaccharides at one month and infant development throughout the first year of infants of a Brazilian cohort.</i> | 67 |
| 6.7 | Aspectos éticos | 68 |
| 7 | RESULTADOS | 70 |
| 7.1 | Artigo 1 | 71 |
| 7.2 | Artigo 2 | 95 |
| 8 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 135 |
| 9 | REFERÊNCIAS | 137 |
| 10 | ANEXOS | 156 |

APRESENTAÇÃO

Este trabalho é um recorte do estudo maior denominado “*Compostos bioativos do leite humano e associação com a saúde materna e o desenvolvimento infantil*”. O estudo maior 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. As análises dos oligossacarídeos do leite humano foram financiadas pelo professor Lars Bode, da Universidade de San Diego/Califórnia.

Trata-se de uma coorte prospectiva com acompanhamento de gestantes e seus filhos, com início no terceiro trimestre da gestação (entre 28 e 35 semanas gestacionais) até o primeiro ano de vida da criança. O estudo foi desenvolvido pela equipe de pesquisadores do Observatório de Epidemiologia Nutricional do Instituto de Nutrição Josué de Castro (INJC) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). O recrutamento aconteceu entre Fevereiro de 2017 e Abril de 2019 e o projeto foi concluído em Janeiro de 2020. A coleta de dados ocorreu na Clínica da Família Assis Valente, situada na Ilha do Governador, zona norte do município do Rio de Janeiro.

O objetivo da presente tese é caracterizar a composição dos oligossacarídeos do leite humano em três períodos diferentes da lactação e verificar a associação desses compostos com o desenvolvimento infantil até doze meses de vida da criança. Este documento encontra-se estruturado de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e contém as seguintes seções: resumo/abstract, introdução, que faz uma abordagem geral sobre a temática da tese, referencial teórico, que traz a literatura recente e pertinente envolvendo o estado da arte dos principais temas que compõe a tese, justificativa, hipóteses, objetivos geral e específicos, métodos, resultados e discussão, considerações finais, referências e anexos.

Os resultados e a discussão foram apresentados sob o formato de dois artigos derivados da tese. O primeiro deles, intitulado *Human milk oligosaccharide profile variation throughout postpartum in healthy women in a Brazilian cohort* foi submetido ao *Journal of Nutrition*. O segundo artigo a ser submetido para publicação é intitulado, *Human milk oligosaccharides bound sialic acid and diversity and infant development at one, six and 12 months in full term healthy children of a Brazilian cohort*.

Na seção de considerações finais são apresentadas compilações com as conclusões dos dois artigos. Os anexos contêm os questionários (anexo 1 – *online*) utilizados durante a coleta de dados do projeto, bem como, o protocolo de coleta de leite humano (anexo 2 – *online*), os pareceres consubstanciados dos Comitês de ética em pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e defesa civil do Rio de Janeiro e da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Anexos 3 e 4), o termo de consentimento livre e esclarecido para participar da pesquisa (Anexo 5) e as sintaxes das análises estatísticas realizadas para a tese no softwere R do artigo 1 (anexo 6) e do artigo 2 (anexo 7). Os documentos dos anexos *online* encontram-se disponíveis para livre acesso na pasta:
<https://drive.google.com/drive/folders/19HWFljNCPZyqZy3VM3MXTSudAgIiCtqz>.

RESUMO

Introdução: Os oligossacarídeos do leite humano (OLH) são glicanos não conjugados, que promovem a saúde infantil. **Objetivos:** 1) Descrever a composição e as variações de OLH no pós-parto e verificar quais características demográficas, reprodutivas e antropométrica maternas podem estar associadas a essa composição; 2) Estimar a associação dos OLH e a diversidade dos OLH entre 28 e 50 dias pós-parto e o desenvolvimento infantil (DI) até 12 meses. **Métodos:** Coorte prospectiva, com 147 participantes na linha de base (28-35 semanas gestacionais) acompanhadas em cinco seguimentos: 2-8 (visita 1), 28-50 (visita 2), 88-119 (visita 3), 180-223 (visita 4) e 365-404 dias pós-parto (visita 5). Amostras de leite foram coletas nas visitas 1 ($n=52$), 2 ($n=75$) e 3 ($n=46$). Os OLH foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. O DI foi avaliado com o *Age and Stages Questionnaire* traduzido para o português (ASQ-BR) nas visitas 2 ($n=73$), 4 ($n=51$) e 5 ($n=45$). 1) Foi realizado teste de Friedman com *posthoc* para a variação de OLH no tempo e fatoração matricial não negativa para o perfil de OLH de acordo com características maternas. 2) Foi realizada regressão de Cox e modelos de risco competitivo de acordo com os modelos Fine & Gray para estimar a associação das concentrações e a-diversidade de OLH com o risco cumulativo das crianças estarem na zona de monitoramento no DI. **Resultados:** 1) A maioria das mulheres era secretora (89,1%). Menores concentrações totais de OLH (g/L) foram encontradas aos 88-119 dias. Paridade, peso e índice de massa corporal (IMC) pré-gestacional e ganho de peso gestacional foram moderadamente correlacionados com os OLH. Mães com peso normal apresentaram iacyl-lacto-N-tetraose c (LSTc) e aquelas com excesso de peso, primíparas ou que estavam no segundo filho tiveram o 2'-fucosilactose (2'FL) como a maior contribuição para os perfis de OLH. 2) O aumento de uma unidade de 3-fucosilactose (3FL) (IC 95% 0,003-0,830) e lacto-N-hexose (LNH) (IC 95% 0,004-0,530) reduziu em 5% a razão de risco de subdistribuição (SHR) de estar na zona de monitoramento para comunicação. Um aumento no fucosyllacto-N-hexose (FLNH) (IC 95% 0,01-0,96) e no disialyllacto-Ntetraose (DSLNT) (IC 95% 0,10-0,65) reduziu, respectivamente, 12% e 25% no SHR de estar na zona de monitoramento para coordenação motora fina. Além disso, o lacto-N-tetrose (LNT) (IC 95% 0,02-0,47) e Shannon (IC 95% 0,05-0,78) reduziram, respectivamente, 10% e 21% no SHR de estar em zona de monitoramento para ≥ 2 domínios durante o primeiro ano de vida da criança.

Conclusão: Concentrações mais baixas de OLH (g/L) no período mais tardio e o IMC pré-gestacional e a paridade, foram associados à composição de OLH. Concentrações mais altas de

LNT e LNH, OLH fucosilados (3FL e FLNH) e sialilados (DSLNT) e o índice de Shannon reduziram o SHR de crianças estarem na zona de monitoramento do DI ao longo do primeiro ano, quando eventos competitivos são considerados.

Palavras chave: Aleitamento materno; Leite humano, Oligossacarídeos, Análise de sobrevida, Desenvolvimento infantil, IMC pré-gestacional.

ABSTRACT

Background: Human milk oligosaccharides (HMO) are unconjugated glycans, which promote child health. **Objectives:** 1) To describe the variation of HMO concentrations in the postpartum period and to verify which maternal characteristics may be associated with this composition; 2) To estimate the association between concentration and α -diversity of HMOs at 28-50 days postpartum and infant development (ID) until 12 months of infant's life. **Methods:** Prospective cohort, with 147 participants at baseline (28-35 gestational weeks) followed in five visits: 2-8 (visit 1), 28-50 (visit 2), 88-119 (visit 3), 180-223 (visit 4) and 365-404 days after birth (visit 5). Human milk samples were collected at visits 1 ($n = 52$), 2 ($n = 75$) and 3 ($n = 46$). The HMOs were analyzed by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. The ID was evaluated by Age and Stages Questionnaire translated to Portuguese (ASQ-BR) at visits 2 ($n=73$), 4 ($n=51$) and 5 ($n=45$). 1) Friedman test with posthoc for the variation of HMOs over time and non-negative matrix factorization for the HMO profile according to maternal characteristics were performed. 2) Cox regressions and competing risk according to Fine & Gray models were performed to estimate the association of HMOs with a cumulative risk of infants in the monitoring zone, considering domains of infant development as competitive events. **Results:** 1) Most women were secretor (89.1%). Lower total HMO concentrations (g/L) were found at 88-119 days. Pre-gestational weight and body mass index (BMI), parity and gestational weight gain were moderately correlated with HMOs. Normal-weight mothers had Normal-weight mothers had a sialyl-lacto-N-tetraose c (LSTc) and those with overweight or primiparous or who were with their second child had 2'-fucosylactose (2'FL) as the major contribution to the HMOs profiles. 2) The increase of one unit of 3-fucosylactose (3FL) (95% CI 0.003-0.830) and lacto-N-hexaose (LNH) (95% CI 0.004-0.530) reduced in 5% the sub-distribution risk ratio (SHR) of being in monitoring zone for communication. An increase in fucosyllacto-N-hexaose (FLNH) (95% CI 0.01-0.96) and in disialyllacto-Ntetraose (DSLNT) (95% CI 0.10-0.65) reduced, respectively, 12% and 25% in the SHR of being in the monitoring zone for fine motor skills. Additionally, lacto-N-tetrose (LNT) (95%CI 0.02-0.47) and Shannon (95%CI 0.05-0.78), reduced, respectively, 10% and 21% in the SHR of being in monitoring zone for ≥ 2 domains. **Conclusion:** Lower total HMOs concentrations in g/L were found in 88-119 days compared with other visits, and pre-pregnancy BMI and maternal parity were associated with HMO composition. Higher concentrations of LNT and LNH, fucosylated (3FL and FLNH) and sialylates (DSLNT) HMOs and the Shannon diversity reduced the SHR of

infants to be in the monitoring zone of infant development throughout first year, when competitive events are considered.

Key words: Breastfeeding; Human Milk; Oligosaccharides; Survive analyses, Infant development, Pre-pregnancy BMI.

1 INTRODUÇÃO

O leite humano (LH) é considerado um alimento condicionalmente perfeito para o crescimento e desenvolvimento infantil (DI) (ERICK, 2018). Essa característica é atribuída devido sua composição dinâmica que se modifica ao longo do período de lactação para atender as necessidades nutricionais e promover a saúde da criança (ANDREAS *et al.*, 2015; BALLARD; MORROW, 2013). A produção e ejeção de LH resulta de uma complexa ação hormonal direta entre prolactina e ocitocina (DYBALL; LENG, 1986; FREEMAN; KANYICSKA; LERANT; NAGY, 2000; RIDDLE; BATES; DYKSHORN, 1933). Fatores ambientais como exposição a situações de estresse e ausência de apoio familiar e fatores inerentes a própria mãe, como idade e paridade, podem exercer influência no aleitamento materno (AM) (DIMITRAKI *et al.*, 2016; DYBALL; LENG, 1986; FREEMAN *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2012).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que o aleitamento materno exclusivo (AME) ocorra até os seis meses de vida da criança, e que somente o LH, diretamente da mama ou extraído, seja oferecido, sem o consumo de água, sucos ou chá (WHO, 2009). Somente 10% dos países no mundo tem prevalência de AME $\geq 60\%$. Nesse sentido, diversas estratégias globais têm sido promovidas com o objetivo de aumentar a prevalência de AME até os seis meses. Nos continentes americanos, a maioria dos países apresenta prevalência entre 20 e 40% (WHO; UNICEF, 2017). As estratégias de promoção ao AME são consideradas imprescindíveis, pois além de promover o adequado desenvolvimento e crescimento da criança, ajudam a reduzir as taxas de mortalidade infantil (WHO, 2001).

Diversos estudos já evidenciaram que o AM proporciona efeitos protetores na saúde da criança. Entre eles, destaca-se a redução do risco de desenvolver doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) ao longo da vida, como obesidade e diabetes mellitus (PEREIRA; ALFENAS RDE; ARAUJO, 2014; VERDUCI *et al.*, 2014). Esses estudos mostraram ainda a alta proteção do AM contra doenças infecciosas, além da promoção do desenvolvimento cognitivo infantil adequado, o que consequentemente resulta em maiores níveis de escolaridade e maior nível de renda na vida adulta (CRUME *et al.*, 2012; HORTA; LORET DE MOLA; VICTORA, 2015; STUEBE; SCHWARZ, 2010; VERDUCI *et al.*, 2014).

O LH contém macro e micronutrientes que proporcionam a adequada nutrição infantil, assim como outros compostos que desempenham importantes funções no organismo infantil e por isso são considerados compostos bioativos. Entre esses destacam-se os ácidos graxos (AG)

de cadeia curta, imunoglobulinas, interleucinas, fatores de crescimento (FC) e outros fatores anti-inflamatórios (BALLARD; MORROW, 2013). Os oligossacarídeos do leite humano (OLH) são açúcares complexos não conjugados e que tem sua composição estabelecida por determinantes genéticos maternos (BODE, 2012). Recentemente, características maternas modificáveis como o IMC e fatores ambientais como a estação do ano, também foram descritos como possíveis determinantes na variação desses compostos (AZAD *et al.*, 2018; MCGUIRE *et al.*, 2017).

A maior parte desses OLH não são digeríveis e exercem papel pré-bióticos, desempenhando efeito bifidogênico e influenciando a formação da microbiota intestinal infantil (BODE, 2012; BOREWICZ *et al.*, 2019). No entanto, pequena parte desses OLH é absorvido no intestino, sendo encontrados na urina, fezes e soro infantil. Esses OLH podem atuar nas funções cognitivas, influenciando o DI, uma vez que há evidências da presença desses compostos nos gangliosídeos (GOEHRING *et al.*, 2014; UNDERWOOD *et al.*, 2015; WANG, 2009a; WANG *et al.*, 2015).

Contudo, há um número restrito de estudos que investigaram como os OLH podem se modificar ao longo dos meses iniciais da lactação, assim como, quais as características maternas modificáveis que podem influenciar a composição desses OLH. Além disso, estudos observacionais em humanos sobre a associação dos OLH com crescimento e DI são escassos. Apenas um estudo sobre o tema foi encontrado na literatura científica latino-americana (TONON *et al.*, 2019).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Definição de aleitamento materno

O AM consiste no consumo do leite da mãe independente do recebimento de outros alimentos pela criança (BRASIL, 2009). A produção do LH resulta da interação endócrina de hormônios como a prolactina e a ocitocina, os quais têm ação fisiológica primordial durante o AM. A prolactina é produzida e secretada pela adenohipófise, e é responsável pela produção de LH (FREEMAN *et al.*, 2000; RIDDLE; BATES; DYKSHORN, 1933). A ocitocina é um nanopeptídeo produzido pela neurohipófise, que atua como hormônio mensageiro e age na liberação e ejeção de leite (DYBALL; LENG, 1986).

Essa ação hormonal pode ser influenciada por fatores sociodemográficos, psicossociais e estímulos externos durante a amamentação. Características maternas como maior faixa etária, maior nível de escolaridade, multiparidade, situação de trabalho (estar de licença maternidade ou não trabalhar), ter tido acesso a serviços de orientação para o AM e parto vaginal foram fatores positivamente relacionados à maior prevalência de AM. Baixos níveis de confiança materna em manter o AM, maiores níveis de dificuldade durante o AM e o retorno ao trabalho foram fatores relatados como empecilho para a manutenção do AM (DE JAGER *et al.*, 2014; HUNEGNAW; GEZIE; TEFERRA, 2017; PATNODE *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2012; TEWABE, 2016; TEWABE *et al.*, 2016).

2.2 Perspectivas históricas e recomendações para o aleitamento materno

Ao longo do tempo, estratégias de promoção e aconselhamento sobre a amamentação têm sido estabelecidas no âmbito mundial e são reconhecidas como essenciais para uma maior adesão e manutenção do AM (FELTNER *et al.*, 2018). Entre essas estratégias, tem-se a iniciativa hospital amigo da criança (*Baby-Friendly Hospital Initiative*), publicada em 1990 pela OMS e pelo Fundo das Nações Unidas para Infância - *United Nations Children's Fund* (UNICEF) e atualizada em 2009. Essa estratégia foi desenvolvida com o objetivo de constituir uma rede promotora, protetora e de suporte ao AM (WHO; UNICEF, 1990; WHO; UNICEF, 2009). Em 2017 a OMS lançou um Guia com orientações para proteção, promoção e apoio a amamentação em instituições prestadoras de serviços a maternidade e recém-nascido (RN) com

o objetivo de fornecer recomendações globais, baseadas em evidências científicas, e como uma intervenção de saúde pública (WHO, 2017).

No Brasil, a história das políticas públicas de incentivo ao AM tem diversos marcos como criação do Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno (PNIAM) em 1981 (BRASIL, 1991), e a criação da Rede de Banco de Leite Humano (BLH) em uma iniciativa da Fundação Osvaldo Cruz e do Ministério da Saúde (MS) em 1998 (MAIA; NOVAK; ALMEIDA; SILVA, 2004). O BLH brasileiro é referência mundial entre um conjunto de estratégias estabelecidas como precursores do cenário atual com a implementação dos Hospitais Amigos da Criança e o estabelecimento da Norma Brasileira de Comercialização de Alimentos para Lactentes e crianças de primeira infância, bicos, chupetas e mamadeiras (**Quadro 1**) (BRASIL, 2009b; BRASIL, 2017).

As atuais orientações do MS estão baseadas nos 10 passos para o aleitamento materno da OMS/UNICEF (*Ten Steps to Successful Breastfeeding*) preconizam que: a) deve ser incentivado o contato pele a pele entre mãe e neonato imediatamente após o parto; b) a mãe deve ser estimulada a amamentar na primeira hora imediatamente após o nascimento da criança; e c) os profissionais de saúde devem fornecer o suporte necessário na primeira mamada. Tais ações são primordiais para o sucesso no AM, bem como, para consolida-lo como importante fator de promoção da saúde neonatal (BRASIL, 2014; WHO, 2018).

2.3 Classificação do aleitamento materno e efeitos na saúde materna e infantil

O MS classifica o AM em quatro categorias com base no que a OMS preconiza: a) exclusivo, quando o lactente recebe apenas o LH, sem ingestão de outros líquidos, exceto xaropes e medicamentos; b) predominante, quando além do LH, há a ingestão combinada com água, suco ou chá; c) misto ou parcial, quando o lactente ingere LH e outros tipos de leites ou fórmulas, e d) complementado, quando o LH e outros alimentos são ingeridos (BRASIL, 2009; WHO, 2007).

O AME deve ser realizado até seis meses de vida da criança, e posteriormente outros alimentos devem ser introduzidos, iniciando assim a alimentação complementar. Entretanto, o AM deve ser mantido por pelo menos dois anos (BRASIL, 2014; WHO, 2017). Os benefícios associados a prática do AME em países em desenvolvimento incluem a prevenção de déficit no crescimento infantil e a prevenção da mortalidade infantil (BIKS *et al.*, 2015; KUCHENBECKER *et al.*, 2015).

Quadro 1. Ações de promoção e proteção do aleitamento materno no Brasil.

| Ano | Ações | Ano | Ações | Ano | Ações |
|------|--|------|--|------|---|
| 1974 | Portaria Estadual/99 proibição de propaganda e de distribuição de leite SES/PE | 1996 | Portaria GM/MS 2.415: Prevenção da contaminação do HIV pelo LH | 2011 | IV Seminário Nacional de Políticas Públicas em AM |
| 1976 | Criação do II Programa nacional de alimentação e nutrição | 1999 | Portaria MS 50 Institui a comissão nacional de banco de LH | 2012 | Lançamento da Estratégia Amamenta e Alimenta Brasil no <i>World Nutrition</i> |
| 1979 | Reunião OMS/Unicef: sobre “Alimentação de lactentes e crianças pequenas” | 2000 | Portaria GM/MS 693 Norma de implantação do método mãe canguru | 2012 | Portaria 930 Diretrizes: atenção integrada e humanizada aos RN grave |
| 1981 | Portarias 42 e 198: Grupo técnico executivo do PNIAM | 2001 | Publicação da Portaria MS 2.051 estabelece os Novos Critérios da NBCAL | 2013 | Publicação da Portaria 1.920 Institui a Estratégia amamenta e alimenta brasil |
| 1983 | Portaria INAMPS/MS 18 - Permanência do bebê com a mãe (alojamento conjunto) | 2002 | Portaria GM/MS 698 Normas de atuação e funcionamento de banco de LH | 2013 | V Seminário nacional de políticas públicas em AM |
| 1988 | Aprovação pelo Conselho Nacional de Saúde da NBCAL | 2003 | Portaria GM/MS 1.893 Institui o dia nacional de doação de LH 1/10 | 2014 | Portaria 1.153 Incluiu os critérios cuidado amigo da mulher na IHAC |
| 1988 | Portaria MS 322 Regula a instalação e funcionamento dos bancos de LH | 2006 | Lei 11.265 Regulamenta comercialização de alimentos - 1ª infância e MS 618: CNAM | 2015 | Política Nacional de Atenção Integral à Saúde da Criança Portaria GM/MS 1.130 |
| 1988 | Constituição Brasileira direito da mulher trabalhadora: 120 dias licença maternidade | 2006 | I Seminário nacional de políticas públicas em AM | 2015 | VI Seminário nacional de políticas públicas em AM |
| 1990 | Portaria 1.390 Institui a Comissão central de bancos de LH | 2007 | II Seminário Nacional de Políticas Públicas em AM | 2015 | Decreto 8.552 Regulamenta Lei 11265 da NBCAL |
| 1990 | Estatuto da Criança e do Adolescente Lei Federal 8.069 | 2008 | Lei 11.770 Direitos das mulheres, parturientes e puérperas e Portaria GM/MS 2.799 Rede Amamenta Brasil | 2015 | Publicação da Lei 13.227 Determina como o dia 19 de maio o Dia Nacional de Doação de LH |
| 1992 | Resolução 31 com item específico sobre bicos e mamadeiras na NBCAL | 2009 | III Seminário Nacional de Políticas Públicas em AM | 2016 | Publicação da Lei 13.257, que dispõe sobre o marco legal da 1ª Infância. |
| 1992 | 1º Hospital amigo da criança instituto de medicina integral Prof. Fernando Figueira | 2010 | Portaria Anvisa 193 Nota técnica sobre salas de apoio à amamentação | 2017 | Publicação da Lei 13.435, agosto como o Mês do AM - agosto dourado |
| 1994 | Portaria SAS/MS 155 Estabelece diretrizes e normas da IHAC | 2011 | Publicação da Portaria 80 que institui da Iniciativa hospital amigo da criança | 2017 | NT: para ordenha e manipulação do leite cru/ VII Seminário nacional de políticas públicas em AM |

Fonte: Adaptado (resumo) de Ministério da Saúde (BRASIL, 2017).

Nota: SES/PE: Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. OMS: Organização mundial de saúde. Unicef: United Nations Children's Fund. PNIAM: Programa nacional de incentivo ao aleitamento materno. MS: Ministério da saúde. IHAC: Iniciativa Hospital Amigo da Criança. GM: Gabinete do ministro. NBCAL: Norma brasileira de comercialização de alimentos para lactentes e crianças de primeira infância bicos, chupetas e mamadeiras. LH: leite humano. SAS Secretaria de Assistência à Saúde. CNAM: Conselho nacional do aleitamento materno. RN: Recém-nascido NT: Nota técnica.

Adicionalmente, o AM pode prevenir eventos adversos na saúde do lactente, uma vez que ao propiciar a nutrição suficiente fornece condições para o adequado crescimento e DI, além de promover a redução ao longo da vida do risco de infecções e DCNT, como diabetes mellitus 2 e doenças cardiometabólicas (CRUME *et al.*, 2012; STUEBE; SCHWARZ, 2010; VERDUCI *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2018). Esses benefícios podem ser observados em crianças em AM (exclusivo ou não) e parecem estar diretamente associados com a duração da amamentação (BIBBINS-DOMINGO *et al.*, 2016)

Além dos benefícios para a saúde da criança, o AM também foi associado a resultados positivos para a saúde materna em até três anos após o parto, com benefícios sobre a resistência à insulina, na glicemia de jejum e na glicemia após o teste oral de tolerância a glicose (TOTG) (BAJAJ *et al.*, 2017). A amamentação também é considerada um importante fator protetor para a obesidade materna. Um estudo brasileiro revelou que quando mulheres com percentual de gordura corporal semelhantes foram comparadas, mas que amamentaram exclusivamente ou predominantemente, observou-se que cada mês adicional de amamentação representou perda de peso de aproximadamente 0,44 kg (KAC *et al.*, 2004).

O contato pele a pele mãe-RN decorrente do AM também pode exercer efeito positivo sobre a saúde materna. Um estudo comparou mães que tiveram contato pele a pele com o RN após o parto com as que não tiveram. Ambos os grupos foram compostos por mães e seus RN saudáveis e a termo nascidos de parto vaginal. Aquelas que tiveram o contato, imediatamente após o nascimento, apresentaram maiores proporções de AME com seis semanas de vida (72,0% *versus* 57,6%), e maior alívio na dor materna durante a recuperação da episiotomia (incisão efetuada na região do períneo para ampliar o canal de parto) (SHARMA, 2016).

2.4 Prevalência do aleitamento materno

As prevalências de AM ainda estão distantes do esperado, mesmo que os diversos benefícios associados a amamentação sejam reconhecidos pela população. Em 2016, um estudo realizado em diversos países do mundo verificou que 80% das crianças estudadas foram amamentadas alguma vez, entretanto somente 40% o fizeram na primeira hora de vida. As prevalências de AME em crianças menores de seis meses é inferior a 50% na maioria dos países e em países em desenvolvimento com baixa e média renda familiar *per capita* é de 37% (VICTORA *et al.*, 2016). A maioria dos países dos continentes americanos tem prevalência de AME aos 6 meses de idade que varia entre 20-40% (WHO; UNICEF, 2017)

No Brasil, segundo estudo realizado pelo MS (2009a), nas capitais e no Distrito Federal em 2008, a prevalência de AM na primeira hora de vida no conjunto de capitais foi de 67,7%, variando de 58,5% em Salvador/BA a 83,5% em São Luís/MA. A prevalência de AME em crianças menores de seis meses foi de 41,0% com variação de 27,1% em Cuiabá/MT a 56,1% em Belém/PA. Contudo, constatou-se um aumento na prevalência nacional de AME em lactentes menores de quatro meses, de 35,5% para 51,2% quando comparados os dados de 1999 e 2008. Para a capital do estado do Rio de Janeiro as seguintes prevalências foram relatadas em 2008: 65,6%, de AM e 40,7% de AME em crianças menores de seis meses, indicando prevalências semelhantes às apresentadas nacionalmente.

Boccolini *et al.* (2017) realizaram um estudo de tendências temporais sobre os indicadores de AM no Brasil, com dados de diversas pesquisas de base populacional realizadas entre 1986 e 2013. Foram incluídas a Pesquisa Nacional de Saúde Materno Infantil e Planejamento Familiar (PNSMIPF) de 1986, a Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde (PNDS) de 1996, a Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher (PNDS) de 2006 e a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) de 2013. Foi observada evolução da prevalência de AME em crianças menores de seis meses, entre 1986 e 2006 (2,9% a 37,1%), mantendo-se em 36,6% em 2013. A prevalência de AM aumentou de 37,4% em 1986 para 56,3% em 2006, mas recuou levemente para 52,1% em 2013 (**Figura 1**).

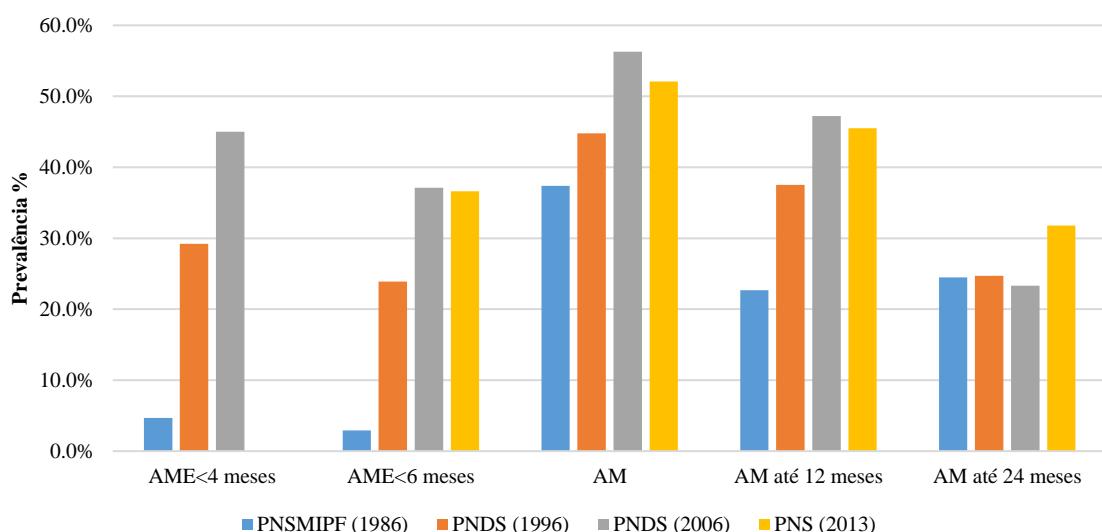


Figura 1. Tendência temporal de indicadores de aleitamento materno de 1986 a 2013 no Brasil de acordo com pesquisas nacionais.

Fonte: Adaptado (baseado na tabela) de Boccoline *et al.* (2017).

Nota: AME: Aleitamento materno exclusivo; AM: aleitamento materno; PNSMIPF: Pesquisa nacional de saúde materno infantil e planejamento familiar; PNDS: Pesquisa nacional de demografia e saúde; PNS: Pesquisa nacional de saúde

2.5 Composição e classificação do leite humano

O LH é o alimento condicionalmente ideal para o neonato por fornecer macro e micronutrientes, além de ser considerado de boa digestibilidade, pois a maior parte de seus compostos são absorvíveis e aproveitáveis pelo intestino do lactente. No entanto, uma parcela desse conteúdo é de componentes não digeríveis, mas que possuem funcionalidade no intestino infantil. Esses componentes são denominados de compostos bioativos e são considerados importantes fatores de proteção do organismo humano e promotores de saúde (BALLARD; MORROW, 2013).

A composição do LH é complexa e dinâmica, e o mesmo se modifica ao longo do período pós-parto, para atender as necessidades nutricionais e imunológicas da criança (ANDREAS *et al.*, 2015; BALLARD; MORROW, 2013). Assim, o LH promove proteção passiva ao lactente para doenças e infecções ao transmitir compostos imunológicos como anticorpos e glóbulos brancos (PALMEIRA; CARNEIRO-SAMPAIO, 2016; RUIZ *et al.*, 2017). A composição do LH varia de acordo com o período puerperal, e há ainda, importante variabilidade na definição do leite de cada período (**Quadro 2**).

Quadro 2. Classificação do leite humano de acordo com o tempo pós-parto.

| Classificação para o leite humano/composição | | | Referência |
|--|--------------------|--------------|----------------------------------|
| Colostro | Leite de transição | Leite maduro | |
| Dias pós-parto | | | |
| 1 - 5 | 6 - 15 | ≥15 | Lawrence (1994) |
| 2 - 3 | 7 - 14 | ≥14 | WHO (2009) |
| 1 - 4 | 5 - 14 | 28 – 42 | Ballard e Morrow (2013) |
| 1 - 5 | 6 - 15 | ≥15 | Giuffrida <i>et al.</i> , (2016) |
| 1 - 6 | -- | ≥21 | Munblit <i>et al.</i> , (2016) |
| 1 - 5 | 6 - 14 | ≥15 | Cao <i>et al.</i> , (2017) |

O colostro é o primeiro LH a ser produzido após o parto e em geral ocorre em pequenos volumes. A composição majoritária é de imunoglobulinas, sobretudo as IgA, elevado teor de proteínas e vitaminas lipossolúveis e citocinas, e baixo teor de lactose. O colostro também é dotado de maior função imunológica do que nutricional quando comparado ao leite maduro (PALMEIRA; CARNEIRO-SAMPAIO, 2016). O LH de transição é produzido posteriormente

ao colostrum e possui composição imunológica semelhante, porém com concentrações inferiores de citocinas como a interleucina 10 e a interleucina 12 (BALLARD; MORROW, 2013; YILMAZ; SAYGILI-YILMAZ; GUNESACAR, 2007). O LH maduro possui concentrações de macronutrientes pouco variáveis ao longo do período pós-parto (0,9 a 1,2 g/dL de proteína; 3,2 a 3,6 g/dL de lipídios e 6,7 a 7,8 g/dL de carboidratos - lactose), e menores concentrações de fatores imunológicos e de proteção que o colostrum e o leite de transição (BALLARD; MORROW, 2013; WHO, 2009).

2.6 Compostos bioativos do leite humano e efeitos na saúde infantil

Os principais compostos bioativos do LH incluem os FC, fatores imunológicos, leptina, imunoglobulinas, interleucinas, lipídios e OLH (**Quadro 3**). Esses compostos podem atuar de forma relevante no metabolismo, no desenvolvimento da imunidade, maturação intestinal com a formação da microbiota intestinal, influenciando significativamente a saúde dos lactentes (BALLARD; MORROW, 2013; COLLADO *et al.*, 2012; NOLAN; PARKS; GOOD, 2019). Alguns fatores como o consumo alimentar e o estado nutricional materno podem interferir nessa composição, principalmente em compostos como a leptina, a grelina e os ácidos graxos (DE LUCA *et al.*, 2016; KON *et al.*, 2014; MÄKELÄ *et al.*, 2013; NOLAN; PARKS; GOOD, 2019).

A leptina é um hormônio peptídico que regula a ingestão de alimentos, a homeostase energética, e a função neuroendócrina (PARK; AHIMA, 2015). De Luca *et al.* (2016) não observaram variação de proteínas, carboidratos, lipídios e energia total no LH segundo o estado nutricional materno. Contudo, as concentrações de leptina foram significativamente mais elevadas no leite de mães obesas em comparação com mães com peso normal. No estudo de Miralles *et al.* (2006) observaram em 28 mães eutróficas ou com sobrepeso (IMC entre 16,3 e 27,3 kg/m²) que as concentrações de leptina no LH com um mês pós-parto foram negativamente relacionadas com o IMC infantil aos 12 e 24 meses de vida da criança (MIRALLES *et al.*, 2006).

Larsson *et al.* (2018) observaram que crianças em AME e com excesso de peso aos cinco meses de idade recebiam LH com menores concentrações de leptina, quando comparadas com crianças em AME, mas com peso adequado para idade. No entanto os autores ressaltaram que outros fatores relacionados a composição do leite podem exercer influência no ganho de peso excessivo e precisam ser melhor investigados.

Quadro 3. Principais compostos bioativos do leite humano

| Compostos | Função |
|------------------------------|--|
| Imunoglobulinas | |
| IgA/sIgA | Inibição de ligação de patógeno |
| IgG | Anti-microbiana, ativação da fagocitose |
| IgM | Aglutinação e ativação do complemento |
| Citocinas | |
| IL-6 | Estimulação da resposta de fase aguda (de células B, pró-inflamatória) |
| IL-7 | Aumento do tamanho e saída do timo |
| IL-8 | Recrutamento de neutrófilos pró-inflamatórios |
| IL-10 | Repressão da inflamação do tipo Th1, indução da produção de anticorpos |
| IFN γ | Pro-inflamatório, estimula a resposta Th1 |
| TGF β | Anti-inflamatório, estimulação das mudanças de fenótipo das células T |
| TNF α | Estimula a ativação imune inflamatória |
| Hormônios | |
| Calcitonina | Desenvolvimento de neurônios entéricos |
| Somatostatina | Regulação do crescimento epitelial gástrico |
| Anti-microbial | |
| Lactoferrina | Proteína de fase aguda, ferro quelado, anti-bacteriana, antioxidante |
| Lactadherina/MFGE8 | Anti-viral, anti-inflamatório: aumenta a fagocitose de células apoptóticas |
| Hormônios metabólicos | |
| Adiponectina | Redução do IMC infantil e peso, anti-inflamatório |
| Leptina | Regulação da conversão de energia e IMC infantil, regulação do apetite |
| Grelina | Regulação da conversão de energia e do IMC infantil |
| Oligossacarídeos | |
| Oligossacarídeos | Prebiótico, estimulando a colonização benéfica |
| Glycosaminoglycanos | Desenvolvimento cerebral; anti-infeccioso |

Fonte: Adaptado de Ballard e Morrow (2013) e Nolan, Parks e Good (2019).

Nota: IgA: Imunoglobulina A; IgG: Imunoglobulina G; IgM: Imunoglobulina M; IL: Interleucina; TGF: *Transforming growth factor*; TNF: *Tumor Necrosis Factor*; MFGE8: *milk fat globule-EGF factor 8 protein*. IMC: índice de massa corporal.

Os lipídios do LH também exercem importante ação no DI. Um estudo realizado na França com crianças aos 5-6 anos observou associação inversa entre as concentrações de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) n6:n3 do colostrum com o quociente de inteligência infantil (QI). Neste estudo, o alto teor de ácido linoleico (AL) no colostrum (>9,84%) e as baixas concentrações do ácido docosa-hexaenóico (DHA) foram associados à QIs mais baixos. Adicionalmente, crianças que foram amamentadas com colostros com baixas concentrações de ácido

araquidônico (AA) (<0,86%) e AGPI n-3 (<1,23%) apresentaram QI intermediário quando comparadas com aquelas amamentadas com colostros com alto AA e AGPI n-3 e com as nunca amamentadas (BERNARD *et al.*, 2017).

Em um estudo realizado por Mäkelä *et al.* (2013) com 100 mulheres finlandesas identificou-se que o estado nutricional materno associou-se com as concentrações de AGPI no LH. Mães com excesso de peso pré-gestacional ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) apresentaram maiores concentrações de ácido graxo saturado e relação n-6/n-3, e menores concentrações de n-3 AGPI no leite quando comparado com as de peso adequado ($\text{IMC} < 25 \text{ kg/m}^2$).

Os FC constituem-se em outros compostos biologicamente ativos presentes no LH que desempenham atividades imprescindíveis para o DI. O FC neural atua no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso. Enquanto, o FC do endotélio vascular atua na vascularização e na angiogênese e é encontrado em maiores concentrações no início do período de lactação. O FC do hepatócito atua na organogênese e pode regular a síntese do FC do endotélio vascular. O FC epidérmico age na maturação e proteção do intestino, e por fim o FC semelhante a insulina protege o ericrótico e atua na eritropoiese (**Figura 2**) (GILA-DIAZ *et al.*, 2019). Outro grupo de compostos com bioatividade são os OLH, os quais tem efeitos bifidogênicos e neurotróficos, além de desempenhar papel essencial durante o crescimento e o DI (BODE, 2012; BOREWICZ *et al.*, 2019; KUNZ *et al.*, 2000).

2.7 Oligossacarídeos do leite humano (OLH)

Os OLH fazem parte da fração de carboidratos e são o terceiro componente sólido mais abundante no LH. Os OLH são sintetizados a partir da lactose podendo ser alongados por unidades de dissacarídeos lacto-N-biose ou N-acetilactosamina. Esses compostos são constituídos por glicose, galactose, N-acetylglucosamina, fucose (ligada em a1-2, a1-3 ou a1-4), e ácido siálico (AS) ligado em a2-3 ou a2-6 (**Figura 3**) (BODE, 2012). Até o momento, foram identificadas mais de 150 estruturas distintas de OLH. Contudo, cerca de 20% desse total possui estruturas representativas de aproximadamente 90% da composição total de OLH (BODE, 2019; URASHIMA *et al.*, 2018).

Os OLH são compostos majoritariamente não digeríveis e resistentes à ação gástrica, e somente pequena parcela é absorvida no intestino delgado (ENGFER *et al.*, 2000). Alguns estudos descreveram a presença de OLH em fluidos corporais infantis, como urina e fezes, comprovando essa resistência. Adicionalmente, foram também encontrados OLH no soro e no

plasma de crianças, provavelmente relacionados à ação sistêmica desses compostos no organismo infantil (GOEHRING *et al.*, 2014; RUHAAK *et al.*, 2014; UNDERWOOD; GAERLAN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

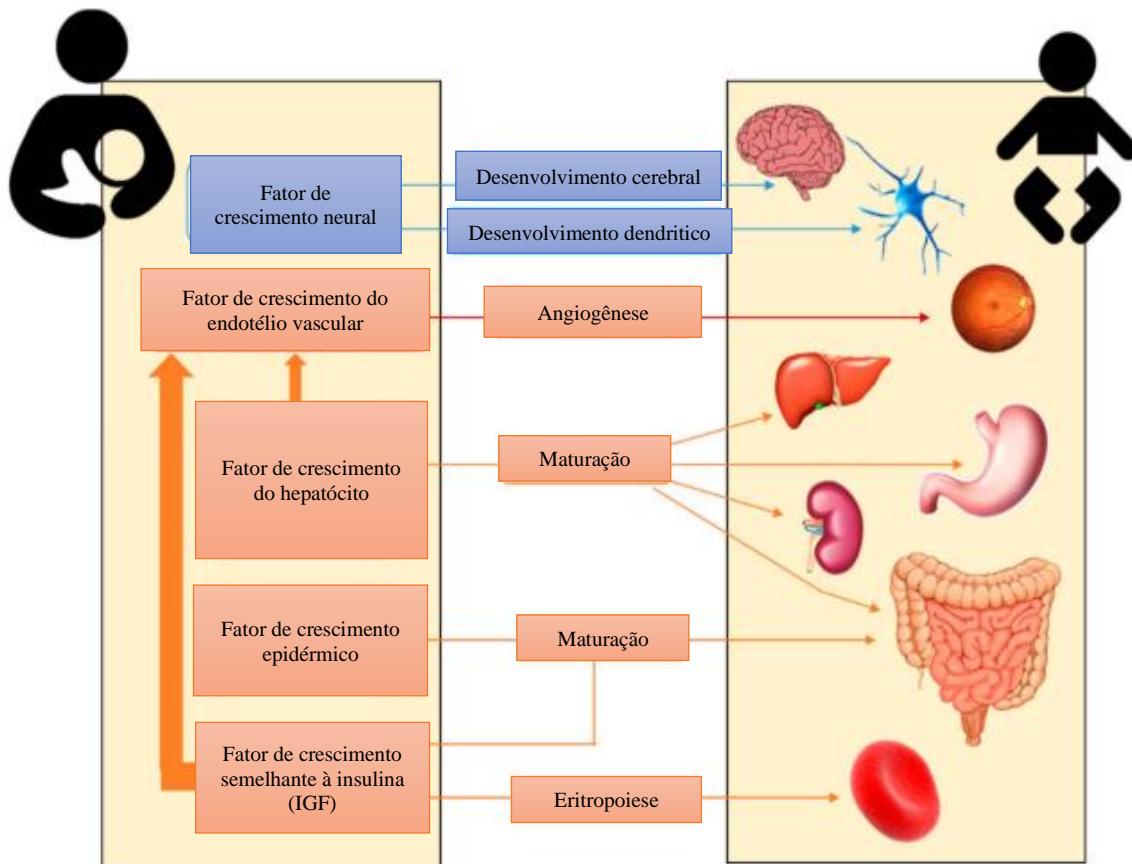


Figura 2. Papel dos fatores de crescimento neural, do endotélio vascular, do hepatócito, epidérmico e semelhante à insulina no desenvolvimento de diversos tecidos e órgãos da criança.
Fonte: Gila-Diaz *et al.* (2019) (tradução da autora).

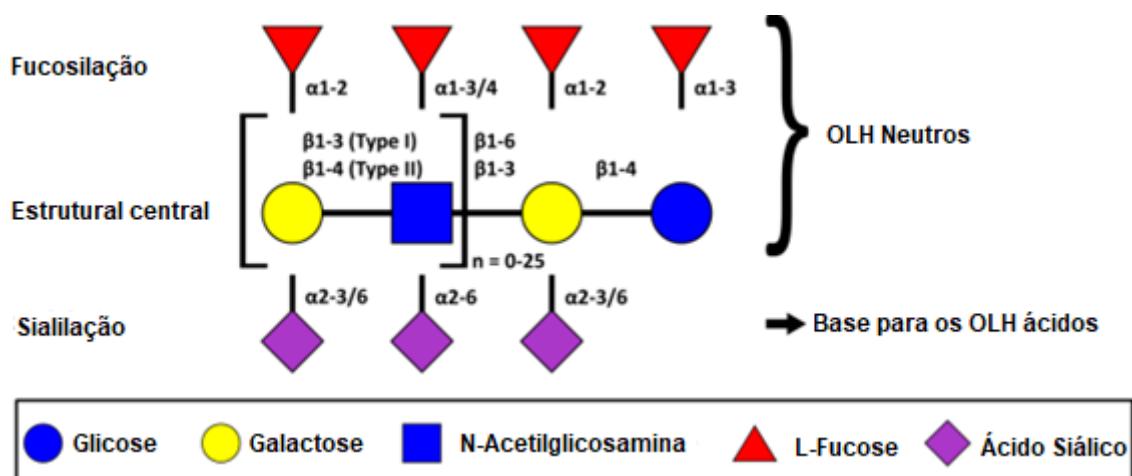


Figura 3. Composição e estrutura geral dos oligossacarídeos do leite humano

Fonte: Bode (2012) (tradução da autora)

Nota: OLH: Oligossacarídeos do leite humano

2.8 Fatores associados as concentrações de oligossacarídeos do leite humano (OLH)

As concentrações de OLH podem variar segundo idade gestacional ao nascimento (pré-termo ou a termo) e ao estágio de lactação. Alguns estudos observaram que o leite de mães de crianças pré-termo apresentou maiores concentrações de OLH do que o leite de mães de crianças a termo (AUSTIN *et al.*, 2019; GABRIELLI *et al.*, 2011). Adicionalmente, as concentrações totais de OLH encontradas no colostro (20 a 25 g/L) foram maiores quando comparadas ao leite maduro (5 a 15 g/L) (MCJARROW *et al.*, 2019; THURL *et al.*, 2017).

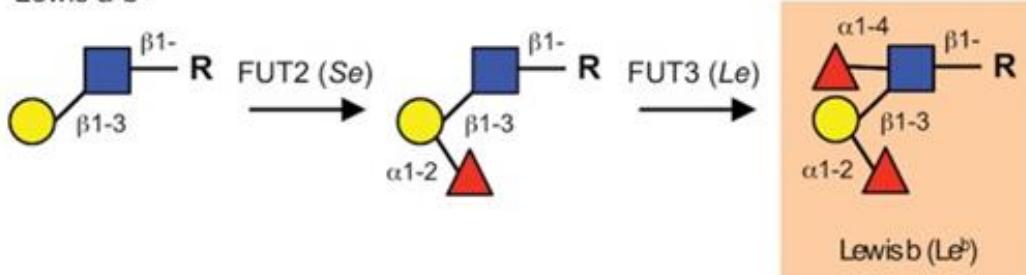
As características genéticas maternas também desempenham papel importante na composição e variação dos OLH. Polimorfismos de nucleotídeo único (*Singles nucleotide polymorphisms* - SNPs) no gene Secretor, que codifica a enzima fucosiltransferase-2 (FUT2), e no gene de Lewis, que codifica a fucosiltransferase-3 (FUT3), contribuem em grande parte para a variação na composição de OLH entre diferentes mulheres (JOHNSON; WATKINS, 1992; KUMAZAKI; YOSHIDA, 1984). Mulheres com uma enzima FUT2 ativa são secretoras e produzem leite com altas concentrações de OLH fucosilados, como o 2'fucosilactose (2'FL) e o Lacto-N-fucopentaose 1 (LNFP 1). No entanto, mulheres com SNPs específicos que não possuem a expressão da enzima FUT2, são não-secretoras e apresentam concentrações muito baixas de 2'FL ou LNFP1 no leite (**Figura 4**) (BODE, 2012; BODE; JANTSCHER-KRENN, 2012; SMILOWITZ *et al.*, 2014; STANLEY; CUMMINGS, 2017).

Alguns estudos sugerem que fatores ambientais podem estar associados a variações na concentração de OLH, além dos fatores genéticos. Em um estudo realizado na Gâmbia com 33 pares de mães/filhos, observou-se que mães que tiveram filho na estação chuvosa, apresentaram concentrações significativamente maiores de OLH (vinte semanas após o parto) do que mães que tiveram filhos na estação seca. Tal diferença pode ser atribuída à provável variação na disponibilidade de alimentos, indicando indiretamente que o consumo materno pode estar associado à composição de OLH (DAVIS *et al.*, 2017).

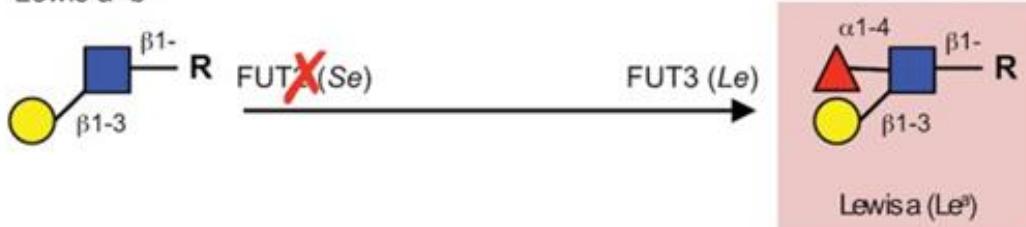
Outro estudo realizado com 90 mulheres chinesas aos 40 dias pós-parto, constatou que o maior consumo materno de vitamina A, avaliado por um questionário de frequência de consumo alimentar foi significativamente associado a maiores concentrações de AS no LH. Esse achado pode ser explicado pela relação da vitamina A com as glicoproteínas do AS (QIAO *et al.*, 2013).

Grupo 1: Lewis-positivo Secretor (Se+Le+)

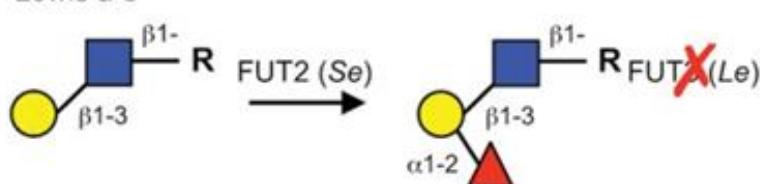
Lewis a-b+

**Grupo 2: Lewis-positivos Não-secretor (Se-Le+)**

Lewis a+b-

**Grupo 3: Lewis-negativo Secretor (Se+Le-)**

Lewis a-b-

**Grupo 4: Lewis-negativo Não-secretor (Se-Le-)**

Lewis a-b-



Figura 4. Fucosilação dos oligossacarídeos do leite humano, expressão dos genes secretor e de Lewis e das enzimas Fucosiltransferase 2 (FUT 2) e Fucosiltransferase 3 (FUT 3) na determinação da estrutura e complexidade dos OLH.

Fonte: Bode (2012) (tradução da autora)

Jorgensen *et al.* (2017) em um estudo randomizado com 647 mulheres de Malauí constataram que a suplementação de ferro e ácido fólico a partir de 20 semanas gestacionais até o parto ou de um composto com 16 micronutrientes incluindo vitamina A ou de suplementos nutricionais a base de lipídios (ácido linoléico - AL e ácido alfa linoleico - AAL) até seis meses pós-parto, não gerou impacto na composição de OLH. Não foram observadas diferenças entre nas concentrações de OLH entre os grupos que receberam os três tipos de suplementação.

Seppo *et al.* (2019) avaliaram 81 mulheres finlandesas e constataram que a suplementação com probióticos foi associada a composição de OLH, especificamente para compostos como o 3-fucosilactose (3FL) e 3'-sialilactose (3'SL). Mulheres que receberam os probióticos apresentaram maiores concentrações desses OLH no colostrum do que as participantes do grupo controle (833 vs 516 µmol/mL). No entanto, observou-se associação inversa entre a suplementação e as concentrações de difucosilacto-N-hexaose (DFSNH), lacto-N-tetraose (LNT), lacto-N-fucopentaose I (LNFP I) e 6'-sialilactose (6'SL), ou seja, o grupo não suplementado apresentou maiores concentrações desses OLH.

Outros fatores podem estar correlacionados à composição de OLH. No estudo de McGuire *et al.* (2017) observou-se que quanto maior o IMC da mãe, maiores as concentrações de 6'-sialilactose, fucodisialilacto-N-hexa e o disialilacto-N-hexaose e menores as concentrações de 2'-fucosilactose. Entretanto, ainda não há evidência suficiente para estabelecer explicações para possíveis mecanismos dessas correlações.

2.9 Associação dos oligossacarídeos do leite humano com a saúde infantil

Associações entre OLH e os desfechos relacionadas à saúde infantil são descritas na literatura. Os OLH foram associados ao desenvolvimento da imunidade do lactente, uma vez que, contêm fatores tolerogênicos que influenciam as células dendríticas derivadas de monócitos e, assim, modulam o desenvolvimento do sistema imunológico infantil (XIAO *et al.*, 2019). Adicionalmente, os OLH atuam como potentes inibidores da adesão bacteriana às superfícies epiteliais, o que diminui o risco de quadros de infecções em crianças (BODE *et al.*, 2004). Além disso, esses compostos do LH são capazes de modular a composição da microbiota do colostrum materno e consequentemente, a partir do consumo infantil do LH, modular positivamente a microbiota intestinal da criança (AAKKO *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2015).

O estabelecimento da microbiota intestinal infantil parece ser regulado pelos OLH, uma vez que estes atuam selecionando as cepas bacterianas como substrato mesmo em casos de suplementação com microrganismos vivos (UNDERWOOD *et al.*, 2017). Estudos demonstraram que em crianças amamentadas os OLH exercem efeito modulando a microbiota e reduzindo o risco de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 1 (BAZANELLA *et al.*, 2017; XIAO *et al.*, 2017).

Observou-se ainda, que os OLH foram associados positivamente a desfechos infantis como o crescimento e DI (BODE, 2006; KOBATA, 2010; KUNZ *et al.*, 2000; SPRENGER *et*

al., 2017). Maior diversidade de OLH foi associada a menor peso corporal total e menor percentual de gordura em crianças (ALDERETE *et al.*, 2015). O efeito positivo de OLH (2’fucosilactose) na memória e aprendizagem de roedores já foi demonstrado em estudos com modelos animais. Foi constatada ainda, maior expressão de marcadores cerebrais, como a proteína densidade pós-sináptica 95, em roedores que receberam o 2’fucosilactose (VAZQUEZ *et al.*, 2015). Assim, apesar dos OLH apresentarem estreita relação com o DI, estudos observacionais em humanos são escassos e apresentam resultados inconclusivos.

2.10 Crescimento e desenvolvimento infantil

O crescimento é definido como um processo dinâmico no qual ocorrem modificações em nível celular e tecidual que geram o aumento do tamanho corporal, denominado crescimento linear (BRASIL, 2002). Esse crescimento é potencialmente influenciado por questões genéticas e passível de influência de componentes ambientais (JOHNSON *et al.*, 2011; STEINBERG; BOMSTEIN; VAND ELL, 2010). O crescimento é considerado um importante indicador de saúde infantil por encontrar-se associado ao ambiente em que a criança vive, ao consumo alimentar, a condição de saúde e exposição a doenças ou fatores de risco (BRASIL, 2002; JOHNSON *et al.*, 2011).

O crescimento infantil (CI) desde o nascimento até 24 meses de vida pode ser avaliado a partir das curvas de crescimento da OMS que apresentam os índices de peso para idade (P/I), comprimento para idade (C/I), peso por comprimento, (P/C) e IMC para idade (IMC/I) (WHO, 2006). Esses índices são utilizados para avaliar o estado nutricional da criança (BRASIL, 2011).

O desenvolvimento humano compreende um processo que envolve crescimento e modificação corporal sistemática ao longo da vida. Trata-se de um conjunto de mudanças biológicas e psicológicas, que sofrem influências do contexto social no qual o indivíduo está inserido (MAGNUSSON; CAIRNS, 1996). A infância é definida como o período entre 0 e 10 anos de vida (UNEP; UNICEF; WHO, 2002) e o DI corresponde a todas as modificações fisiológicas, psicológicas e maturacionais que ocorrem durante esse ciclo.

O DI é composto por um conjunto de domínios que integram o desenvolvimento cognitivo, a aprendizagem, o desenvolvimento social e emocional e o desenvolvimento físico. Tais domínios não devem ser avaliados de maneira isolada, pois não atuam individualmente e sim de forma integrada e comunicante (IOM, 2015). Assim como o CI, o DI está sujeito a fatores intrínsecos e extrínsecos. Como intrínsecos, têm-se os fatores biológicos ou genéticos

inerentes a criança, como prematuridade, malformações congênitas, ou condições neurológicas, além de outros componentes genéticos. Como fatores extrínsecos são descritos os estímulos, a alimentação adequada, condições socioeconômicas e acesso a serviços de saúde (BRASIL, 2002).

Uma revisão sistemática da literatura (RSL) identificou a existência de um total de 278 instrumentos/escalas mais frequentemente utilizadas para avaliação do DI. Desses 278, sete atenderam a todos os critérios de elegibilidade que incluiam: ter sido relatado em um estudo científico, ser no idioma inglês, português, espanhol ou francês e ter relatado a utilização de pelo menos um instrumento psicométrico para avaliação do DI. De acordo com a RSL cinco instrumentos foram considerados com boa a excelente propriedade psicométrica. São eles: *Bayley Scales of Infant Development* (Bayley-III, n=46), *Vineland Adaptive Behavior Scale* (Vineland-II, n=28), *Mullen Scales of Early Learning* (edição AGS, n=21), *Ages and Stages Questionnaire* (ASQ-3, n=19) e *Battelle Developmental Inventory* (Battelle-2, n=15) (SILVA et al., 2018).

Nos países de baixa e média renda foi desenvolvido e disponibilizado pelo banco mundial, um conjunto de ferramentas para medir o desenvolvimento na primeira infância e para auxiliar na seleção de escalas de avaliação do DI de acordo com as diferentes características e objetivos de estudos. Nesse documento são descritas um total de 148 escalas, acompanhadas de informações como, o tipo da escala (rastreio ou teste de habilidades), domínios do DI contemplados, país de origem e países que já utilizaram as escalas, intervalo de idade avaliado, recursos necessários e tipo de aplicação (auto aplicado ou pelo entrevistador), requisitos para aplicação, entre outras informações, além de um conjunto de recomendações para seleção do instrumento mais pertinente ao estudo (FERNALD et al., 2017).

No Brasil, em dezembro de 2019, uma cooperação do MS e do IBGE determinou que a avaliação do DI fosse incluída na Pesquisa Nacional por Amostra de Domicilio contínua. A avaliação será por meio do modelo de monitoramento de indicadores do DI proposto pelo Projeto PIPAS (Primeira Infância para Adultos Saudáveis) e deve iniciar em 2020 (VENANCIO et al., 2019; BRASIL; IBGE, 2019). Essa estratégia considera que essa fase da vida é imprescindível para promoção de saúde ao longo da vida.

2.11 Fatores sociodemográfico e clínicos associados ao desenvolvimento infantil

Alguns fatores sociodemográficos presentes na primeira infância podem estar relacionados com o DI. Um estudo realizado com crianças argentinas constatou que a baixa escolaridade dos pais foi associada a atrasos no DI (GARIBOTTI; COMAR; VASCONI; GIANNINI *et al.*, 2013). A exposição materna a condições precárias de habitação e a insalubridade também são importantes fatores para o baixo peso ao nascer e o nascimento pré-termo (HARVILLE; RABITO, 2018). Essas condições são consideradas fatores de risco para atrasos no DI, comprometimento no CI e maior risco de mortalidade infantil (TAKEUCHI *et al.*, 2016; VELOSO *et al.*, 2019).

Estudos realizados com amostras da população brasileira descreveram que fatores como a interação com o meio social, ambiente de convivência acolhedor e estimulante, apoio familiar, baixos níveis de ansiedade e baixos níveis de estresse materno, são alguns dos fatores relacionados positivamente com o DI. Adicionalmente, características como idade e escolaridade materna foram positivamente correlacionadas com as pontuações de desenvolvimento da linguagem (CRUZ; SILVA; LEMOS, 2011; PEREIRA *et al.*, 2014). É possível observar ainda relação indireta entre fatores sociodemográficos maternos e o DI e CI, quando esses fatores podem impactar na alimentação da criança. Dubois e Girard (2003) constaram que mães com idade maior que 35 e com maior escolaridade (\geq ensino médio) foram as que amamentaram desde o nascimento e introduziram a alimentação complementar com quatro meses ou mais de vida da criança.

Em resumo, o CI e DI são passíveis de influencia tanto de fatores sociodemográficos diversos, bem como das práticas alimentares, como o AM. O AM é considerado um determinante para o adequado desenvolvimento neuropsicomotor e cognitivo, associado assim, a melhores desempenhos em teste de inteligência, com possível efeito na escolaridade e renda dos indivíduos na idade adulta (HALPERN; FIGUEIRAS, 2004; HALLAL; MARQUES; BRACCIALLI, 2008; HORTA; LORET DE MOLA; VICTORA, 2015).

2.12 Oligossacarídeos do leite humano e desenvolvimento infantil

Para o assunto abordado neste tópico, foi realizado um levantamento bibliográfico no portal *Pubmed* (base de dados MEDLINE) sobre a relação entre os OLH e o CI e DI, com o

objetivo de se obter o quantitativo de publicações disponíveis sobre o tema. Para isso, foram utilizados os descritores apresentados no **Quadro 4**.

Quadro 4. Estratégia de busca bibliográfica.

| Tema | Descritores |
|--------------------|--|
| OLH (n= 1898) | ((Milk, Human[MeSH] OR Human Milk[Title/Abstract] OR Breast Milk[Title/Abstract] OR Milk Breast[Title/Abstract] OR Colostrum[MeSH] OR Colostrum[Title/Abstract]) AND (Oligosaccharides[MeSH] OR Oligosaccharides[Title/Abstract])) |
| OLH e DI (n=31) | ((Milk, Human[MeSH] OR human milk OR breast milk OR milk breast OR Colostrum[MeSH] OR colostrum) AND (Oligosaccharides[MeSH] OR oligosaccharides OR sialic acid OR sialyllactose OR sialylated OR fucosylated OR 2-fucosyllactose OR 3-fucosyllactose OR 3-sialyllactose OR 6-sialyllactose OR difucosyllactose OR difucosyllacto-N-hexaose OR difucosyllacto-N-tetraoses OR disialyllacto-N-hexaose OR disialyllacto-N-tetraose OR fucodisialyllacto-N-hexaose OR fucosyllacto-N-hexaose OR lacto-N-fucopentaose OR lacto-N-hexaose OR lacto-N-neotetraose OR lacto-N-tetrose OR sialyllacto-N-tetraose-b OR sialyllacto-N-tetraose-c)) AND (brain OR infant development OR intelligence OR cognitive OR motor skills OR communication OR personal-social OR problem-solving) |

Estudos em humanos relacionando OLH e o CI ainda são recentes na literatura. De forma geral, a diversidade de OLH, e os OLH fucosilados e silaliados são descritos como os mais associados ao ganho de peso infantil. Alderete *et al.*, (2015) constataram que maior diversidade de OLH foi associada a menor percentual de gordura em crianças com um mês de vida e o LNFP I (OLH fucosilado) foi negativamente associado ao peso infantil com um e seis meses.

Pekmez *et al.* (2019) observaram pares de 26 mães e crianças dinamarquesas e constataram menor diversidade de OLH (índice de Simpson), menores concentrações dos OLH silaliados 6SL e DSLNH e maiores concentrações de 2'FL no LH de mães de crianças com ganho de peso excessivo quando comparadas com as de adequado ganho de peso aos cinco meses de vida. Ainda, Larsson *et al.* (2019) estudaram 30 pares de mãe e crianças dinamarquesas. Esses autores observaram que tanto o 2'FL, quanto as concentrações de fucosilados ligados aos OLH foram positivamente correlacionadas com o IMC das crianças acompanhadas aos cinco meses de vida. No único estudo encontrado com a população brasileira que avaliou o LH de 78 mulheres, Tonon *et al.*, (2019) observaram que o peso de crianças entre

17 e 76 dias de vida foi inversamente correlacionado com as concentrações de 3'SL no leite de mães secretoras.

Os compostos fucosilados foram diretamente associados ao ganho de peso infantil (LARSSON et al., 2019; MAESSEN *et al.*, 2019). Os OLH também são considerados importantes para o desenvolvimento cognitivo (KUNZ *et al.*, 1999; SCHANLER *et al.*, 1999; NEWBURG, 2005; WANG, 2009). Diversos estudos desenvolveram modelos experimentais com animais para investigar os mecanismos responsáveis pela associação do OLH com o DI (CERDÓ; DIÉGUEZ; CAMPOY, 2019; OLIVEROS *et al.*, 2016; VAZQUEZ *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2007). Wang *et al.*, (2019) observaram em leitões que a alimentação com OLH sililiados foi relacionada com maiores concentrações no cérebro de metabolitos e neurotransmissores considerados importantes marcadores de neurodesenvolvimento, como o glutamato e a glutamina que atuam na memória e aprendizado.

Um estudo experimental com 20 crianças australianas (amamentadas = 11 e alimentadas com fórmula = 9) diagnosticadas com síndrome da morte súbita, analisou amostras da substância cinzenta do córtex frontal cerebral durante exames post-mortem. Crianças amamentadas apresentaram concentrações maiores de AS nos gangliosídeos do que àquelas alimentadas com fórmula. Outros estudos em humanos encontraram maiores concentrações de AS na saliva de crianças amamentadas, quando comparadas com crianças que consumiam fórmulas infantis (TRAM *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2001). O AS presente no LH pode ser oriundo dos oligossacarídeos, de glicoproteínas e glicolípideos (aproximadamente 1% do total). Contudo, a maior parte desse AS do LH é proveniente dos OLH, sendo duas a três vezes maior que a quantidade oriunda das glicoproteínas (BODE; JANTSCHER-KRENN, 2012).

O AS também está presente nos gangliosídeos e nas glicoproteínas do cérebro de lactentes. Essa presença pode estar relacionada com maior quantidade de gangliosídeos na massa cinzenta e com melhores resultados do desenvolvimento cognitivo, aumentando a diferenciação e a arborização dendrítica durante o neurodesenvolvimento (WANG *et al.*, 2003). Contudo, os mecanismos envolvidos na associação entre as concentrações de OLH e o DI, ainda precisam ser melhor descritos na literatura, principalmente em estudos com humanos. Assim, há necessidade de novos estudos que possam investigar essas lacunas.

3 JUSTIFICATIVA

O AM é considerado uma exposição modificável que exerce grande influência na saúde da mãe e do recém-nascido. A amamentação desempenha um efeito protetor contra intercorrências na saúde materna como a obesidade e o diabetes mellitus após o parto (BAJAJ *et al.*, 2017; KAC *et al.*, 2004), além da redução da dor após episódio de episiotomia (SHARMA, 2016). Para o recém-nascido, o consumo do LH, alimento condicionalmente perfeito, promove o adequado ganho de peso, crescimento e DI (KUCHENBECKER *et al.*, 2015; HORTA; LORET DE MOLA; VICTORA, 2015).

Compreender quais características antropométricas e de estilo de vida materna podem estar associadas a composição do OLH torna-se relevante, considerando que esses compostos desempenham papel nutricional e bioativo importantes na saúde infantil. Em se tratando de características modificáveis da mãe, as evidências aqui encontradas, somadas as já existentes podem ratificar o quanto importante é a condição de saúde pré-concepção da mãe bem como, ao longo da gestação para a saúde da criança e da própria mãe.

O DI é a etapa fundamental do desenvolvimento humano. Nos primeiros anos, é um processo contínuo de aquisição de habilidades e aprendizagem, realizado a partir da interação de fatores biológicos e da saúde e influências do meio em que a criança vive (BARROS, 1986; DORNELAS; MAGALHAES, 2016; NEWTON; WRAITH, 1995). Os resultados dessa tese podem reforçar os benefícios anteriormente evidenciados sobre as contribuições do AM para o DI. Apesar de limitadas evidências em humanos já publicadas (ZHU; LI, 2017) compreender como os OLH podem atuar especificamente no DI e estudar essa associação torna-se relevante, uma vez que o desenvolvimento cognitivo infantil pode exercer impacto para além do período da infância que incluem o baixo rendimento escolar até as relações sociais e laborais na vida adulta. Portanto, compreender se os OLH estão associados ao DI torna-se relevante.

No entanto, pesquisas de acompanhamento ou estudos controlados realizados com seres humanos sobre a associação entre OLH e DI ainda são escassos e, portanto, inconclusivos. Adicionalmente, somente um estudo foi realizado sobre a associação entre OLH e desfechos infantis com a população brasileira (TONON *et al.*, 2019). Entretanto, não foram encontrados estudos sobre OLH e o DI no primeiro ano de vida para esta população. Considerar investigações brasileiras são relevantes, uma vez que alguns fatores foram relatados como relevantes na composição de OLH, como a sozonalidade relacionada indiretamente com a oferta de alimentos (DAVIS *et al.*, 2017).

Estudos observacionais longitudinais com o objetivo de avaliar as concentrações dos OLH e de acompanhamento do DI são primordiais para a melhor compreensão da associação entre ambos. Os resultados dessa pesquisa podem gerar evidências capazes de contribuir com a promoção do AM e prevenção de atrasos no DI.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar a composição dos oligossacarídeos do leite humano em três períodos diferentes da lactação e verificar a associação desses compostos com o desenvolvimento infantil no primeiro ano de vida da criança.

4.2 Objetivos específicos

- i. Descrever a composição e as variações de OLH em três períodos diferentes da lactação (2-8, 28-50 e 88-119 dias pós-parto) e verificar quais características maternas podem estar associadas a essa composição.
- ii. Estimar a associação entre as concentrações individuais e a diversidade dos oligossacarídeos do leite humano em um mês e o desenvolvimento infantil longitudinal ao longo do primeiro ano de vida, para os domínios da comunicação, coordenação motora grossa, coordenação motora fina, resolução de problemas e domínio pessoal-social.

5 HIPÓTESES

- A composição de OLH das mulheres estudadas apresenta menor concentração total aos três meses pós-parto, quando comparadas com os períodos 2-8 e 28-50 dias pós-parto.
- Características maternas como idade, IMC e paridade influenciam na composição de OLH.
- Maiores concentrações individuais de OLH e de ácido siálico e fucosilados ligados aos OLH estão associadas adequado desenvolvimento infantil até o primeiro ano de vida.
- A maior diversidade de OLH estão associadas adequado desenvolvimento infantil até o primeiro ano de vida.

6 MÉTODOS

6.1 Desenho do estudo

A presente tese faz parte de um estudo maior intitulado “Compostos bioativos do leite humano e saúde mental materna e desenvolvimento infantil”. Trata-se de estudo observacional longitudinal prospectivo com uma medida na linha de base e cinco ondas de seguimento, realizado nos seguintes momentos: entre a 28^a e a 35^a semana gestacional (SG), 2 a 8, 28 a 50, 88 a 119, 180 a 216 e 365 a 404 dias após o parto (**Figura 5**). O seguimento de três meses após o parto (Onda 3) foi inserido após o início do estudo e a sua inclusão teve como objetivo, estimar melhor a trajetória de modificações dos OLH ao longo do tempo. Para este estudo, todas as ondas de seguimento foram utilizadas.

6.2 Participantes

6.2.1 Amostra e critérios de elegibilidade

Para o estudo maior foi utilizada uma amostra não probabilística e foram convidadas a participar da pesquisa, gestantes que atendiam os seguintes critérios de elegibilidade:

- Ter entre 18 e 40 anos;
- Estar entre a 28^a e a 35^a semana de gestação;
- Realizar acompanhamento pré-natal na Clínica da Família Assis Valente;
- Não ser portadora de DCNT (diabetes, hipertensão, cardiopatias, exceto obesidade grau I) ou doenças transmissíveis (DT);
- Não ter gestação gemelar.

6.2.2 Critérios de exclusão

Para a realização das análises foram excluídas participantes com as seguintes características:

- Mulheres que não estavam amamentando no período de realização das consultas de 2-8, 28-50 ou 88-119 dias pós-parto;

- Gestantes que após o ingresso no estudo desenvolveram pré-eclâmpsia ou eclampsia, diabetes gestacional ou outra DCNT (exceto obesidade grau I) ou DT;
- Crianças nascidas pré-termo (nascimento <37 semanas gestacionais) ou com alterações decorrentes do parto como hipóxia.

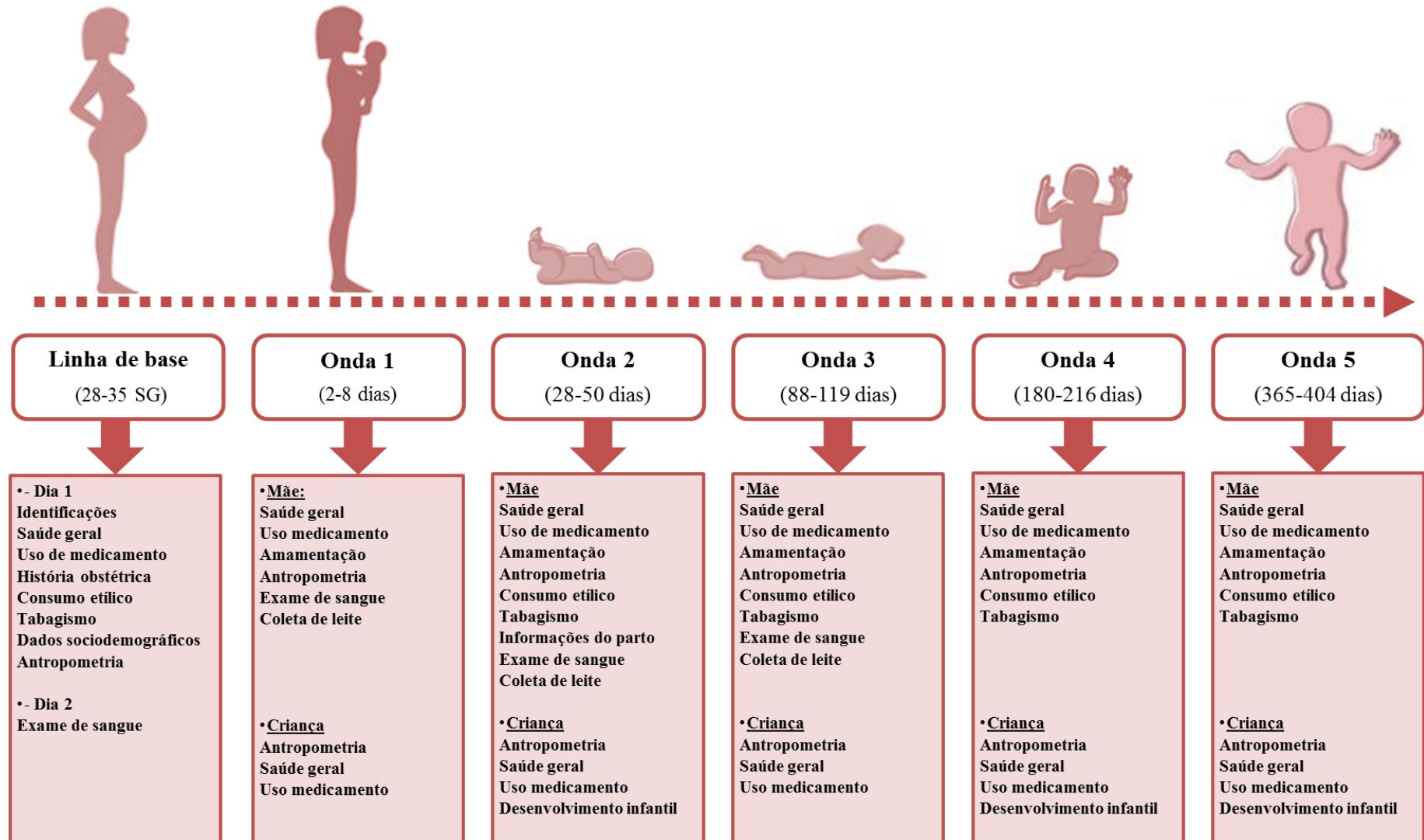


Figura 5. Fluxograma do estudo com os procedimentos e avaliações realizados na linha de base e a cada seguimento.
Nota: SG: semana gestacional.

6.2.3 Recrutamento

As gestantes em acompanhamento pré-natal eram abordadas e solicitadas a responder a um questionário de triagem com perguntas relacionadas aos critérios de elegibilidade. Ao final da aplicação desse questionário era possível identificar as mulheres como ‘não elegíveis’ ou ‘elegíveis’. Informações que possibilassem uma comunicação futura com todas as gestantes abordadas eram registradas em uma planilha de acompanhamento. As gestantes que atendiam a todos os critérios de elegibilidade, exceto a idade gestacional, assim que atingissem o período de 28 a 35 semanas gestacionais eram agendadas para a confirmação das informações contidas no questionário de triagem. Se a elegibilidade fosse confirmada, a gestante era convidada a participar do projeto e era aplicado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

6.3 Local do estudo

O estudo foi realizado na Clínica da Família (CF) Assis Valente, que faz parte da Coordenadoria de saúde da área programática (CAP) 3.1. A CF Assis Valente é uma das 257 unidades públicas de saúde ligadas ao Sistema Único de Saúde (SUS) do Rio de Janeiro e encontra-se localizada na Ilha Governador, Zona Norte do município. Essa clínica foi inaugurada em 2011, e atualmente conta com seis equipes de saúde da família, com cobertura de uma área de abrangência de 2,450,000 metros quadrados, e beneficiou cerca de 28 mil usuários desde a inauguração. Entre janeiro de 2016 e janeiro de 2017, 434 gestantes iniciaram o acompanhamento pré-natal (SMS/RJ, 2011).

6.4 Procedimentos de coleta de dados e amostras biológicas

6.4.1 Coleta e entrada de dados

O *Research Electronic Data Capture* (REDCap) foi utilizado para coletar informações e gerar os bancos de dados. Trata-se de plataforma online, considerada uma ferramenta robusta de entrada de dados, que permite o gerenciamento de estudos com diferentes tipos de desenho. A coleta de dados foi realizada com a utilização de aplicativo de acesso remoto do REDCap, previamente instalado em *tablets* contendo os questionários da pesquisa, pré-formatados no servidor *online*. Após a entrada de dados, foi realizado o envio das informações para a

plataforma online. Essa ferramenta é considerada segura para a construção e gerenciamento de pesquisas e bancos de dados on-line (<http://project-redcap.org/>).

6.4.2 Antropometria infantil

O peso ao nascer (PN) e comprimento ao nascer foram coletados diretamente da caderneta da criança. A criança foi classificada como BPN quando nasceu com menos de 2500g, adequado quando o PN foi $\geq 2500\text{g}$ e $< 4000\text{g}$ e macrossomia quando o PN $> 4000\text{g}$ (WHO, 2016).

O crescimento das crianças até o primeiro ano de vida foi acompanhado utilizadas as curvas da OMS de 0 a 5 anos e os índices de peso para idade, estatura para idade, perímetro cefálico para idade e IMC para idade (WHO, 2006). O peso do lactente foi aferido utilizando uma balança infantil digital da marca Seca modelo 336 (Seca, Hamburg, Alemanha). A realização da medida foi feita com a criança sem roupas e acessórios. O comprimento do lactente foi aferido utilizando o infantômetro da marca Seca modelo 417 (Seca, Hamburgo, Alemanha). O lactente permaneceu somente de fralda. O perímetro cefálico foi aferido utilizando uma fita de medição descartável da marca Seca modelo 211 (Seca, Hamburgo, Alemanha). Para o comprimento e perímetro cefálico foram realizadas duas medidas consecutivas para cálculo da média aritmética, admitindo uma diferença máxima de 0,5 cm para o comprimento e 0,2 cm para perímetro cefálico. Caso a diferença fosse maior, uma terceira medida foi realizada. A definição dos escores-z das crianças avaliadas foi realizada com auxílio do software Stata 15 (zanthro – *the library*) e foram classificados de acordo com as definições do MS (**Quadro 5**) (BRASIL, 2011).

Quadro 5. Classificação dos índices antropométricos em crianças menores de 5 anos.

| Valores críticos | Índices antropométricos para menores de 5 anos | | | |
|--|--|--------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| | Peso para idade | IMC para idade | Estatura para idade | Perímetro cefálico para idade |
| $<\text{Escore-z} -3$ | Muito baixo peso para a idade | Magreza acentuada | Muito baixa estatura para a idade | Alterações |
| $\geq\text{Escore-z} -3 \text{ e } < \text{Escore-z} -2$ | Baixo peso para a idade | Magreza | Baixa estatura para a idade | |
| $\geq\text{Escore-z} -2 \text{ e } < \text{Escore-z} -1$ | Peso adequado para a idade | Eutrofia | Estatura adequada para a idade | Adequado |
| $\geq\text{Escore-z} -1 \text{ e } \leq\text{Escore-z} +1$ | | Risco de sobrepeso | | |
| $>\text{Escore-z} +1 \text{ e } \leq\text{Escore-z} +2$ | | Sobrepeso | | |
| $>\text{Escore-z} +2 \text{ e } \leq\text{Escore-z} +3$ | Peso elevado para a idade | Obesidade | | Alterações |
| $>\text{Escore-z} +3$ | | | | |

Fonte: Ministério da Saúde (BRASIL, 2011) e OMS (2009).

Todas as medidas antropométricas e a padronização das medidas da criança seguiram as recomendações do manual antropométrico do estudo Intergrowth-21st (INTERGROWTH-21ST, 2012).

6.4.3 Procedimento de coleta de leite humano

A coleta de LH ocorreu na clínica de saúde da família e foi realizada conforme as instruções do Protocolo de Coleta de Leite Humano (**Anexo 2 online**). Esse documento foi construído de acordo com as recomendações da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 171 (BRASIL, 2006) e com as determinações da Rede de Banco de Leite Humano (RBLH) (BRASIL, 2006). O procedimento foi realizado conforme o fluxo apresentado na **Figura 6**.

O primeiro passo consistiu em uma conversa entre o pesquisador e a mãe. A participante foi convidada a relatar como se sentia em relação à amamentação e se estava tendo alguma dificuldade para amamentar. Essa etapa foi imprescindível, em função da potencial presença de fatores de vulnerabilidade nesse período de puerpério. É reconhecido que esses fatores podem influenciar no desmame precoce (DUNN *et al.*, 2006).

Na sequência, o procedimento padrão, consistiu no fornecimento de orientações gerais sobre técnicas de massagem, extração e ordenha de alívio para evitar ingurgitamento mamário e mastite. Os protocolos da RBLH foram sempre seguidos. Posteriormente foi solicitado que a participante retirasse os adornos, prendesse os cabelos, colocasse a touca descartável, lavasse as mãos e os antebraços com sabão de clorexidina, e colocasse a máscara. O pesquisador realizou os mesmos procedimentos e adicionalmente calçou as luvas nitrílicas, para caso fosse necessário realizar ou auxiliar a participante no momento da coleta. As luvas nitrílicas foram utilizadas por terem resistência comparável com a luva de látex (PATEL *et al.*, 2004) e não possuírem talco, o que reduziu a possibilidade de contaminação das amostras (DAVE; WILCOX; KELLETT, 1999).

As coletas foram realizadas pela própria lactante de forma manual, diretamente em tubos Falcon de 50 mL, estéreis, livres de RNase e DNase e não pirogênicos. Foram coletados 5 mL de leite na consulta entre 2 e 8 dias, que foram posteriormente divididos em cinco alíquotas de um mL. Na consulta de 28-50 dias e 88-119 dias pós-parto, foram coletados 17 mL, que foram subdivididos em 1 alíquotas de 5 mL e 12 de 1mL O processamento dessas amostras foi realizado imediatamente após a coleta e foram utilizadas ponteiras estéreis, livres de RNase e DNase e não pirogênicos.

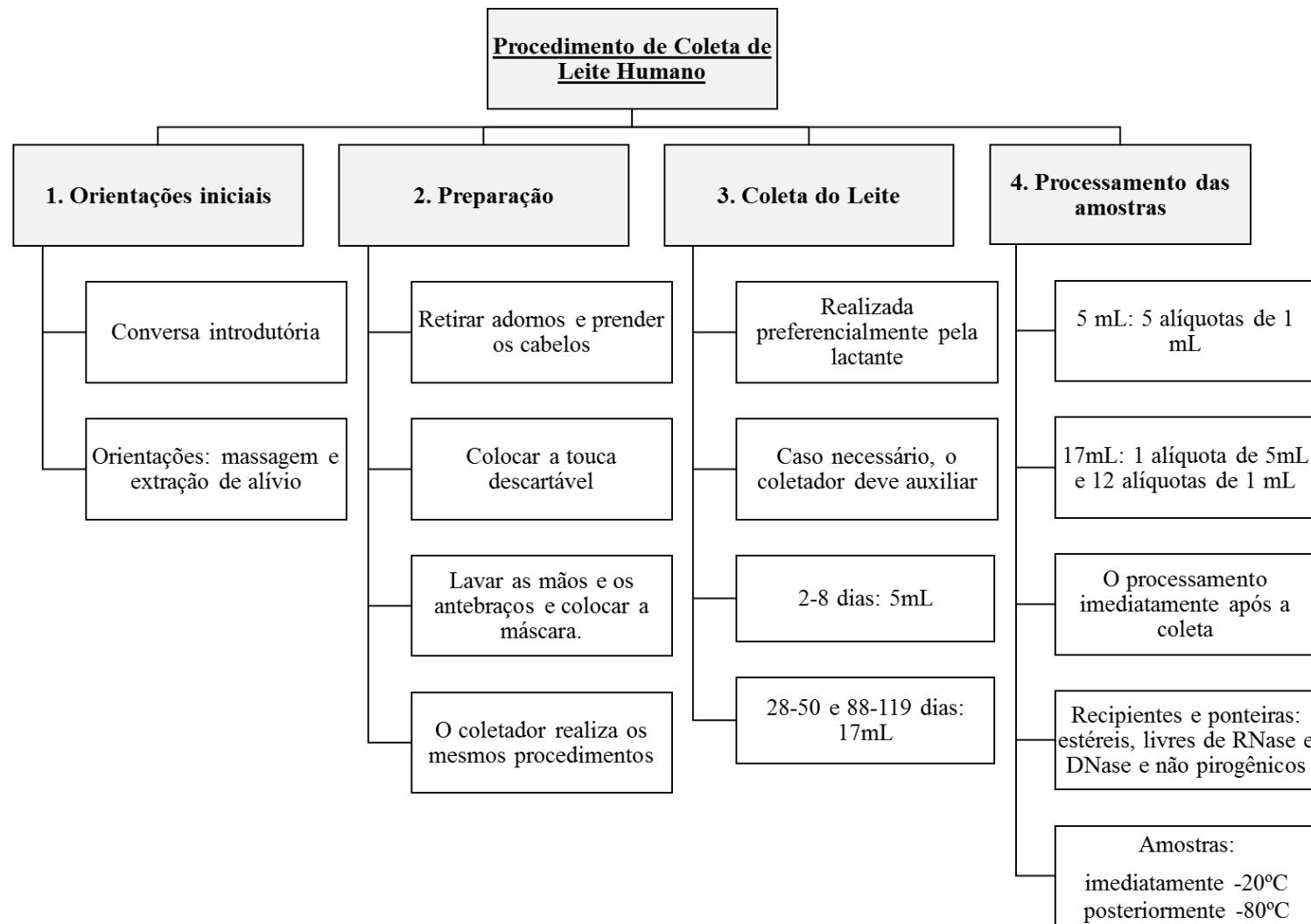


Figura 6. Etapas do procedimento da coleta e processamento das amostras de leite humano.

As amostras foram refrigeradas em freezer a -20°C, e posteriormente transportadas em caixa térmica com controle de temperatura (-1°C a -5°C), e armazenadas em freezer a -80°C no Laboratório de Desenvolvimento de Alimentos para Fins Especiais do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, até o momento das análises.

6.4.4 Análise de oligossacarídeos do leite humano

As análises foram realizadas no ‘*Bode Lab*’, na Universidade da Califórnia em San Diego, em parceria com o Professor Lars Bode. As amostras foram enviadas em gelo seco, em caixa térmica para garantir que o controle de temperaturas próximas a -80°C fossem mantidas até o recebimento.

Os OLH foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência (HPLC-FL). A rafinose (carboidrato não OLH) foi adicionada ao leite como um padrão interno para permitir a quantificação absoluta. Os lipídios e proteínas foram removidos, e os OLH foram retirados por extração em fase sólida de alto rendimento sobre microcolunas C18 e Carbograph e marcados com fluorescência com 2-aminobenzamida (2AB) e separados por HPLC-FL. Os OLH marcados foram analisados por HPLC-FL em uma coluna amida-80 (15 cm de comprimento, 2 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula de 3 µm; Tosoh Bioscience) com um sistema de tampão de formato de amônio-acetonitrila 50 mmol/L. A separação foi realizada a 25°C e monitorada com um detector de fluorescência em excitação de 360nm e emissão de 425nm. A anotação de pico foi baseada em tempos de retenção padrão e analisada em um espectrômetro de massa de armadilha Thermo LCQ Duo Ion, equipado com uma fonte Nano-ESI.

A quantificação absoluta dos 19 OLH a seguir foi determinada com base nas curvas de resposta padrão individuais e em relação ao padrão interno da rafinose: 2'-fucosilactose (2'FL), 3-fucosyllactose (3FL), 3'-sialilactose (3'SL), 6'-sialilactose (6'SL), difucosilactose (DFLac), difucosilacto-N-hexaose (DFLNH), difucosilacto-N-tetrose (DFLNT), disialilacto-N-hexaose (DSLNH), disialilacto-N-tetraose (DSLNT), fucodisialilato (NFD) FDSLNH), fucosilacto-N-hexaose (FLNH), lacto-N-fucopentaose (LNFP) I, LNFP II, LNFP III, lacto-N-hexaose (LNH), lacto-N-neotetraose (LNnT), lacto-N-tetrose (LNT), sialil-lacto-N-tetraose b (LSTb) e sialil-lacto-N-tetraose c (LSTc). O status de secretor foi determinado pela presença ou quase ausência de 2'FL e LNFP I (AZAD *et al.*, 2018; JANTSCHER-KRENN; *et al.*, 2012; MCGUIRE *et al.*, 2017).

Para as análises em grupos de OLH foram considerados: o ácido siálico ligado aos OLH e a fucose ligada aos OLH, calculados como a soma de todas as porções de ácido siálico e fucose ligadas aos OLH medidos, respectivamente. Pequenos OLH foram definidos pelo agrupamento das concentrações de 2'FL, 3FL, 3'SL e 6'SL. Foram consideradas as estruturas estendidas das OLH tipo I (Gal (β 1-3) GlcNAc, LactoN-biose) e tipo II (Gal (β 1-4) GlcNAc, N-acetilactosamina) para classificar esses grupos: o tipo 1 foi calculado com a soma do LNT, LNFP I, LNFP II, LSTb e DSLNT e tipo 2 com LNnT, LNFP III e LSTc. Os grupos de ligações alfa fucosilados foram classificados como com Alpha 1,2 (LNFP I e 2'FL) ou Alpha 1,3 (LNFP III e 3-fucosyllactose) ou como alfa sialilado 2,6 (LSTc e 6'SL).

6.4.5 Desenvolvimento infantil

O desenvolvimento das crianças foi avaliado utilizando a escala *Ages and Stages Questionnaire* versão traduzida para o português (ASQ-BR). A versão original dessa ferramenta foi utilizada em diversos estudos de coorte (CORDIER *et al.*, 2015; DEMESTRE *et al.*, 2016). Trata-se de um instrumento de rastreamento baseado no relato materno/cuidador. O instrumento tem boa propriedade de medida. A sensibilidade variou entre 82 e 89% e a especificidade entre 77 e 92% em estudos realizados com crianças brasileiras do estado do Rio de Janeiro (EICKMANN; EMOND; LIMA, 2016; SILVA *et al.*, 2018).

O ASQ-BR pode ser aplicado em crianças de um a 60 meses de idade e passou por retrotradução para a língua portuguesa e adaptação transcultural, com propriedades psicométricas consideradas satisfatórias (FILGUEIRAS *et al.*, 2013). A escala apresenta adequada consistência (confiabilidade mensurada pelo α Cronbach) (SANTANA *et al.*, 2015).

No presente estudo o ASQ-BR foi aplicado com um, seis e 12 meses de idade. O instrumento encontra-se organizado em cinco domínios: comunicação, coordenação motora ampla, coordenação motora fina, resolução de problemas e pessoal-social (**Figura 7**). A aplicação foi realizada por meio de entrevista, na qual as perguntas dos domínios correspondentes eram respondidas pela mãe, que pode informar se a criança realizou alguma atividade [“ainda não” (0), “às vezes” (5) ou “sempre” (10)]. Cada domínio possui seis itens a serem respondidos e apresentou uma pontuação final de no máximo 60 pontos (SQUIRES *et al.*, 2009a).

A versão original da escala apresenta pontos de corte para cada domínio. Esses pontos de corte classificam as crianças em abaixo do ponto de corte (indicando a necessidade de

avaliação complementar por profissional habilitado), próximo do ponto de corte – risco de atraso no DI estando na zona de monitoramento (desenvolvimento inspira atenção), ou a cima da zona de monitoramento (desenvolvimento dentro do esperado) (**Quadro 6**) (SQUIRES *et al.*, 2009a).

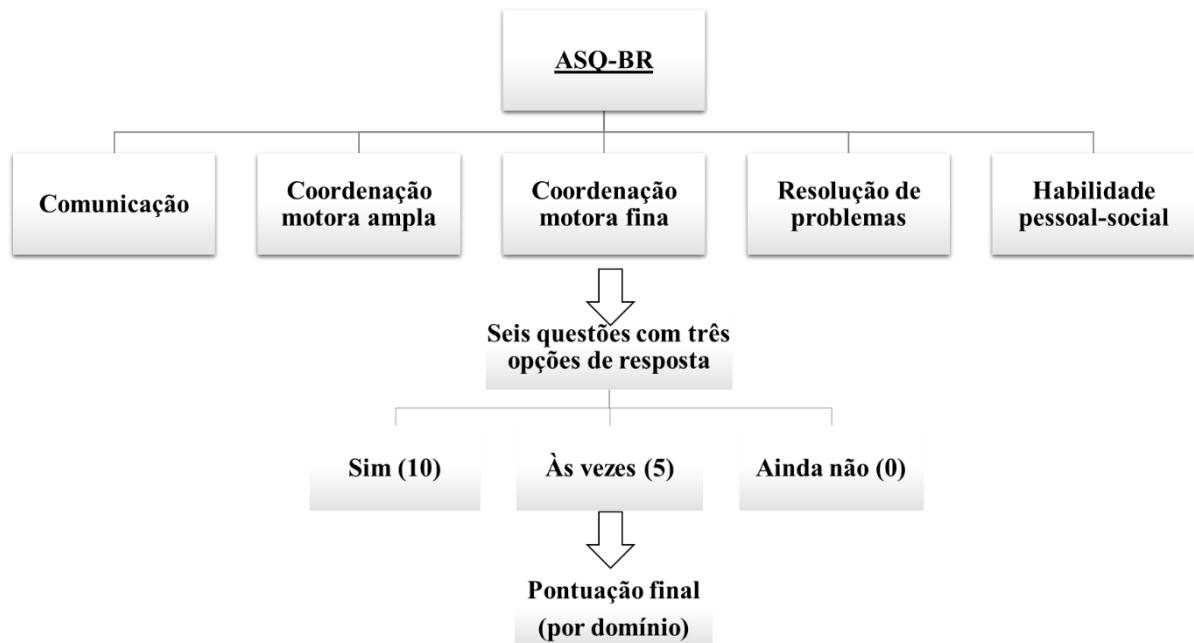


Figura 7. Definições da estrutura do *Age & Stages Questionnaires (ASQ-BR)*.

Fonte: Squires *et al.* (2009a) (tradução da autora).

Quadro 6. Pontos de corte do *Age and Stages Questionnaire (AQS-3)* para crianças americanas.

| Categorias | Comunicação | Coordenação motora ampla | Coordenação motora fina | Resolução de problemas | Pessoal social |
|--------------------------|---------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|----------------|
| 1 mês | | | | | |
| Abaixo do ponto de corte | <22,7 | <41,84 | <30,16 | <24,62 | <33,71 |
| Zona de monitoramento | ≥22,7 <35,19 | ≥41,84 <48,58 | ≥30,16 <39,98 | ≥24,62 <36,55 | ≥33,71 <42,14 |
| Desenvolvimento esperado | ≥35,19 | ≥48,58 | ≥39,98 | ≥36,55 | ≥42,14 |
| 6 meses | | | | | |
| Abaixo do ponto de corte | <29,65 | <22,25 | <25,14 | <27,72 | <25,34 |
| Zona de monitoramento | ≥29,65 <39,27 | ≥22,25 <33,95 | ≥25,14 <37,04 | ≥27,72 <39,06 | ≥25,34 <36,83 |
| Desenvolvimento esperado | ≥39,27 | ≥33,95 | ≥37,04 | ≥39,06 | ≥36,83 |
| 12 meses | | | | | |
| Abaixo do ponto de corte | <15,64 | <21,49 | <34,50 | <27,32 | <21,73 |
| Zona de monitoramento | ≥15,64 <30,00 | ≥21,49 <35,71 | ≥34,50 <43,36 | ≥27,32 <38,16 | ≥21,73 <33,73 |
| Desenvolvimento esperado | ≥30,00 | ≥35,71 | ≥43,36 | ≥38,16 | ≥33,73 |

Fonte: Squires *et al.*, (2009b) (tradução da autora).

Os pontos de corte foram estabelecidos a partir das médias e desvios padrão de 18.572 crianças americanas estudadas, para avaliar a confiabilidade e validade dos questionários. A zona de monitoramento refere-se ao intervalo maior ou igual a um desvio padrão e menor que dois desvios padrão em relação à média (SQUIRES *et al.*, 2009b). Até o momento, não foram estabelecidos pontos de corte específicos para a população brasileira. Dessa forma, para o presente estudo, os pontos de corte americanos foram utilizados para todos os domínios. Para as análises, uma categoria adicional foi criada quando o bebê estava na zona de monitoramento para ≥ 2 domínios. De acordo com a literatura, quando o lactente apresenta desenvolvimento não adequado para ≥ 2 domínios, é um risco significativo e um atraso global do desenvolvimento (DORNELAS; DUARTE; MAGALHÃES, 2015; MAJNEMER; SHEVELL, 1995; SHEVELL *et al.*, 2003). Neste estudo, nenhum lactente foi classificado abaixo do ponto de corte, o que indicaria a necessidade de avaliação complementar por profissional habilitado. No entanto, estar na zona de monitoramento foi considerado um precursor de um possível atraso.

6.4.6 Covariáveis

a) Antropometria materna

O peso corporal da mãe foi mensurado em todas as ondas de seguimento, utilizando balança de coluna digital com capacidade de 300 kg da marca Seca modelo 704 (Seca, Hamburgo, Alemanha). As mães foram medidas sempre descalças com roupas leves e sem adornos e acessórios como relógios.

A estatura foi mensurada por meio de estadiômetro multifuncional Altura Exata (Altura exata, Minas Gerais, BR). A medida foi feita em duplicata e a média calculada. Caso a diferença entre as duas medidas fosse superior a 0,5 cm, duas novas medidas eram realizadas. A medida foi realizada na visita de 28-50 dias pós-parto, pois a realização da mesma não é recomendada ao final da gestação (linha de base do presente estudo), em decorrência de ser um período de grande acentuação da curvatura da coluna lombar.

O Índice de Massa Corporal (IMC) foi obtido por meio da fórmula: $IMC = \text{Peso}/\text{Estatura}^2$ e classificado segundo a OMS (WHO, 1995). O ganho de peso gestacional foi avaliado de acordo com a recomendação do *Institute of Medicine (Quadro 7)* (IOM, 2009). Todas as mensurações antropométricas da mãe foram realizadas segundo o protocolo de Lohman (LOHMAN; ROCHE; MARTORELL, 1988).

Quadro 7. Recomendações de ganho de peso total e por trimestre gestacional.

| Classificação IMC pré-gestacional | IMC (kg/m²) | Total de ganho de peso (kg) | Variação do ganho de peso 2º e 3º trimestre (kg/semana) |
|--|-------------------------------|------------------------------------|--|
| Baixo peso | < 18,5 | 12,5 – 18 | 0,440 - 0,580 |
| Eutrofia | 18,5 - 24,9 | 11,5 - 16 | 0,350 - 0,500 |
| Sobrepeso | 25 - 29,9 | 7 - 11,5 | 0,230 - 0,330 |
| Obesidade | ≥ 30 | 5 – 9 | 0,170 - 0,270 |

Fonte: IOM (2009)

b) Aspectos sociodemográficos

Os seguintes dados sociodemográficos e reprodutivos foram coletados na linha de base do estudo: idade, estado marital, número de filhos, ocupação materna, nível de escolaridade materna e do companheiro, local de moradia, tipo de moradia e renda familiar. Um instrumento foi construído pela equipe de pesquisadores, com base nas questões do estudo censitário do Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE).

c) Tipos de aleitamento materno

A classificação do tipo do AM seguiu a recomendação do MS (**Figura 8**) (BRASIL, 2009). As informações quanto à motivação para realizar o AME, a frequência e o tempo de AM durante todo acompanhamento também foram registrados. Para isso, um questionário utilizando com base os estudos anteriores desenvolvidos pelo observatório de epidemiologia nutricional foi estruturado pelo grupo de pesquisadores (SPYRIDES *et al.*, 2008). O questionário da pesquisa Nascer no Brasil também foi usado como base (FIOCRUZ, 2011) (**Anexo 1 online**).

d) Outros fatores determinantes do DI

Foram investigadas as ocorrências de outros fatores que estão relacionados com desfechos negativos no DI, como: história familiar para atrasos no desenvolvimento, alterações na saúde pregressa e atual da mãe e saúde da criança, durante o período de acompanhamento. Para essas informações foram desenvolvidos questionários específicos (**Anexo 1 online**). Ao longo do acompanhamento, informações sobre alterações na visão e audição da criança também foram coletadas, baseadas no relato materno.

A idade gestacional do parto foi calculada utilizando a primeira medida de ultrassonografia se realizada antes das 22-24 semanas gestacionais (COMMITTEE ON OBSTETRIC PRACTICE, 2017) ou a data da última menstruação.

6.5 Procedimentos de controle de qualidade dos dados

6.5.1 Treinamento dos entrevistadores

Todos os entrevistadores foram previamente treinados. Os treinamentos foram realizados entre julho e outubro de 2016, com a finalidade de minimizar o viés de informação e padronizar as entrevistas e a coletas de dados.



Figura 8. Classificação e definição dos tipos de aleitamento materno.

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde (2009)

Nota: ¹Embora a OMS não reconheça os fluidos rituais (poções, líquidos ou misturas utilizadas em ritos místicos ou religiosos) como exceção possível inserida na definição de aleitamento materno exclusivo, o Ministério da Saúde, considerando a possibilidade do uso de fluidos rituais com finalidade de cura dentro de um contexto intercultural e valorizando as diversas práticas integrativas e complementares, apoia a inclusão de fluidos rituais na definição de aleitamento materno exclusivo, desde que utilizados em volumes reduzidos, de forma a não concorrer com o leite materno.

O treinamento para a coleta de LH em bancos de leite também foi realizado com o objetivo de padronizar a abordagem e procedimento de coleta do LH. Retreinamentos foram realizando periodicamente. Todos os novos entrevistadores passaram por treinamento. Esse procedimento teve o objetivo de manter a qualidade da coleta de dados.

6.5.2 Estudo piloto

O estudo piloto foi realizado após a construção de um sistema de entrada de dados no RedCap e depois de todos os questionários serem testados. Foram acompanhadas 12 participantes entre Novembro de 2016 e Janeiro de 2017. Foram realizadas as entrevistas referentes ao terceiro trimestre gestacional, de 2-8 dias e 28-50 dias pós-parto. Durante esse período, foram realizadas modificações e adequações nos procedimentos e correções, assim como o estabelecimento de fluxos de rotina.

O estudo piloto apresentou limitações, uma vez que foi realizado apenas o acompanhamento das participantes até um mês após o parto. Uma vez que se trata de um estudo longitudinal, com o objetivo de minimizar essa limitação, as entrevistas de 6 e 12 meses após o parto, foram realizadas em mulheres e crianças que estavam no referido período, no momento da realização do piloto. Após todos os ajustes concluídos, o estudo iniciou em Fevereiro de 2017.

6.5.3 Revisão e envio dos questionários

Após a aplicação dos questionários, os mesmos eram sempre revisados por outro entrevistador. Com a conclusão da revisão os dados eram enviados ao sistema, para compor o banco de dados. Esse procedimento é realizado diariamente, o que reduz possíveis erros relacionados pela digitação de questionários, como mudanças ou perda de dados. A cada quinze dias o banco de dados é exportado do sistema para ser avaliado quanto a qualidade dos dados e possíveis erros.

6.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software R, versão 3.6. A distribuição das variáveis foi avaliada por histogramas, medidas de assimetria e curtose e teste de Shapiro Wilk

(Stats Package). Valores extremos da concentração de OLHs não foram excluídos. O teste de Mann-Whitney foi realizado para avaliar diferenças entre as características de mulheres com e sem amostras de leite para investigar possíveis vieses.

6.6.1 Artigo 1 - Human milk oligosaccharide profile variation throughout postpartum in healthy women in a brazilian cohort.

Foram utilizadas medianas e interquartis para descrever características sociodemográficas e antropométricas maternas, concentrações e diversidade de OLH. As variações no grupo OLH durante a lactação foi avaliada usando o teste de Friedman com *posthoc* para comparações múltiplas (usando uma comparação múltipla em pares de classificações médias - pacote PMCMR) e um nível de significância <0,05.

Para análise exploratória, foi realizada uma correlação de Spearman rank com mapas de calor (Pacote Corrplot) para investigar a correlação entre características maternas (idade, escolaridade, paridade, idade gestacional ao nascer, ganho de peso gestacional, ganho de peso gestacional, suplemento de ferro e ácido fólico na gravidez e peso pré-gestacional), IMC pré-gestacional) e OLH e índice de alfa diversidade nos diferentes momentos. Para essas análises, adotou-se nível de significância <0,01 e os níveis de correlação foram interpretados como: 0,00 a 0,19 - correlação muito fraca, 0,20 a 0,39 - correlação fraca, 0,40 a 0,69 - correlação moderada, 0,70 a 0,89 - correlação forte e 0,90 a 1,00 - correlação muito forte (ROWNTREE, 1981).

Um gráfico de barras empilhadas (pacote Ggplot2) foi obtido para apresentar uma concentração absoluta e abundância relativa de OLHs. O índice de diversidade foi calculado usando diversidade e uniformidade de Shannon, uniformidade inversa de Simpson e Pielou (Biodiversity R Package e Vegan Package). Para o índice de comparação de diversidade e uniformidade nas visitas de acompanhamento, foi realizado um teste post-hoc de Friedman para comparações múltiplas.

O dimensionamento multidimensional não métrico (NMDS) foi utilizado para definir o número de dimensões, preservando as diferenças para explorar padrões de perfis de OLH, usando a matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis (metaMDS no pacote vegan e ggplot2). Posteriormente, uma análise dos principais componentes dos perfis OLH foi realizada usando o método Brunet, que identificou três componentes básicos retidos com base na estimativa de classificação. A fatoração matricial não negativa (NMF) foi usada para definir padrões potenciais nos dados do perfil da OLH de acordo com o período pós-parto, estado nutricional

do IMC, paridade e idade materna. Quanto maior a NMF, maiores as probabilidades dessa contribuição de perfil de OLH.

6.6.2 Artigo 2 - Associations between human milk oligosaccharides at one month and infant development throughout the first year of infants of a Brazilian cohort.

Para avaliar a distribuição das variáveis foram usados histogramas, medidas de assimetria e curtose e o teste de Shapiro Wilk. As concentrações dos OLH foram log transformadas. Os índices de Shannon e Simpson foram utilizados para calcular a α -diversidade de OLH (Phyloseq Package) (MCMURDIE; HOLMES, 2013). Um alfa de 0,05 foi adotado para todas as análises estatísticas.

Para investigar possíveis diferenças entre as características das participantes com acompanhamento completo e aquelas com perda seguimento, foram utilizados testes de Mann Whitney. Análises exploratórias foram apresentadas em gráficos de box-plot, para comparar as concentrações medianas de OLH de acordo com o estado de desenvolvimento infantil (na zona de monitoramento / adequado), para todos os domínios e para categoria para ≥ 2 domínios, em cada seguimento, utilizando testes de Mann Whitney.

Os fatores de confusão foram investigados com base em um gráfico acíclico direcionado (*Directed acyclic graph – DAG*) (Ggdag Package) usando o programa DAGitty (TEXTOR; HARDT; KNÜPPEL, 2011). O DAG baseia-se em relações causais entre a exposição, o desfecho e um conjunto de fatores de confusão em potencial e foi desenvolvido a partir de um conhecimento a priori, para identificar um conjunto mínimo, mas suficiente de covariáveis, para remover a confusão da análise estatística. O ajuste minimamente suficiente foi composto pelas seguintes variáveis: idade gestacional ao nascer (semanas), ganho de peso gestacional total (adequado / inadequado), IMC pré-gestacional (kg/m^2), idade materna (anos) e paridade (primíparas / multíparas).

Para investigar as probabilidades dos lactentes estarem na zona de monitoramento durante o acompanhamento foram realizadas Curvas de Kaplan-Meier (pacotes Survival e Survminer). Para estimar a associação entre concentrações individuais e a α -diversidade dos OLH e o risco dos lactentes estarem na zona de monitoramento para comunicação, coordenação motora grossa, coordenação motora fina, resolução de problemas, domínio pessoal-social e ≥ 2 domínios ao longo do primeiro ano de vida, foram realizados modelos de Cox univariados e multivariados. Calculou-se as taxas de risco proporcionais (Hazard Ratios - HR), considerando

modelos condicionais com eventos ordenados e recorrentes (THERNEAU; CROWSON; ATKINSON, 2020). Os diagnósticos dos modelos de Cox foram realizados para avaliar a suposição de riscos proporcionais usando resíduos de Schoenfeld e Martingale para identificar observações influentes. Uma análise de subgrupo foi realizada apenas com as mulheres secretoras e seus filhos, uma vez que, mulheres não secretoras apresentam valores extremos de alguns OLH fucosilados.

Heatmaps (mapas de calor) com taxas de risco ajustadas foram plotados para ilustrar os modelos de Cox univariados e multivariados. Muitos modelos foram inicialmente realizados para estudar a associação entre 19 OLH e os índices de α -diversidade de Shannon e Simpson e os domínios de desenvolvimento infantil longitudinal. Sabe-se que este grande número de modelos pode aumentar a probabilidade de erro do tipo I (LEE; LEE, 2018). Tradicionalmente, métodos como Bonferroni têm sido utilizados para dar conta da multiplicidade. No entanto, esta abordagem é considerada conservadora e uma opção inadequada para o presente estudo, pois esse tipo de correção assume que os testes são independentes (HASHEMI; COMMENGES, 2002; LEE; LEE, 2018). Em vez disso, foram realizados modelos de risco competitivo Fine & Gray com resultados estatisticamente significativos do conjunto de mulheres das Secretoras dos modelos multivariados de Cox. Esses modelos foram realizados para calcular a função de incidência cumulativa (cumulative function incidence – CIF) para estimar a razão de risco de subdistribuição (subdistribution hazard ratios – SHRs) e permitir o ajuste de covariáveis (FINE; GRAY, 1999). Os SHRs estimam o risco da ocorrência de eventos em indivíduos livres de um evento específico e aqueles que anteriormente foram afetados por eventos competitivos. Esse recurso é um estimador mais robusto e adequado, pois reduz a probabilidade de erros aleatórios e inferências de viés (AUSTIN; FINE, 2017). Estar na zona de monitoramento para cada domínio do desenvolvimento infantil foram considerados evento competitivo. Assim, não eventos incluíram censura e aqueles e os que estavam na zona de monitoramento para outros domínios (Poythress; Lee; Young, 2020).

6.7 Aspectos éticos

O projeto foi previamente aprovado pelo 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 sobre o cumprimento dos princípios da não maleficência, beneficência, justiça e equidade.

No momento da captação o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) era explicado para a gestante. Nesse momento foram fornecidos detalhes sobre o número de consultas e os procedimentos em que ela deveria participar. O consentimento por escrito é obtido foi obtido quando a gestante aceitou participar.

Por questões de responsabilidade ética e social, o projeto ofereceu a todas as gestantes da Clínica da Família Assis Valente, atividades de orientação e acolhimento para o AM, independente da mesma ter participado ou não do projeto. Além disso, os coordenadores do projeto desenvolveram ações educativas como rodas de conversa mensais sobre temas diversos relacionados aos cuidados em saúde, nutrição e AM.

7 RESULTADOS

A presente seção encontra-se subdivididas em dois artigos pertinentes ao tema da tese.

Artigo 1: *Human milk oligosaccharide profile variation throughout postpartum in healthy women in a brazilian cohort* (Variações no perfil de oligossacarídeos do leite humano durante o pós-parto de uma coorte de mulheres brasileiras saudáveis).

Artigo 2: *Associations between human milk oligosaccharides at one month and infant development throughout the first year of infants of a Brazilian cohort.* (Associação entre os oligossacarídeos do leite humano com um mês e o desenvolvimento infantil no primeiro ano de vida de crianças de uma coorte brasileira).

7.1 Artigo 1



Human Milk Oligosaccharide Profile Variation Throughout Postpartum in Healthy Women in a Brazilian Cohort

Ana Lorena Ferreira ¹, Ronaldo Alves ¹, Amanda Figueiredo ¹, Nadya Alves-Santos ¹, Nathalia Freitas-Costa ¹, Mônica Batalha ¹, Chloe Yonemitsu ³, Nadia Manivong ³, Annalee Furst ³, Lars Bode ³, and Gilberto Kac ^{1,2,*}

¹ Nutritional Epidemiology Observatory, Department of Social and Applied Nutrition, Institute of Nutrition Josué de Castro, Rio de Janeiro Federal University, Rio de Janeiro, 21941-590, Brazil; analorenaferreiira@gmail.com (A.F.); ronaldoalves@gmail.com (R.A.); amanda.cfg@gmail.com (A.F.); nadyahasantos@gmail.com (N.A.-S.); ncristinacf@gmail.com (N.C.); monicaabatalha@gmail.com (M.B.)

² Graduate Program in Nutrition, Institute of Nutrition Josué de Castro, Rio de Janeiro Federal University, Rio de Janeiro, 21941-590, Brazil

³ Department of Pediatrics and Mother-Milk-Infant Center of Research Excellence, University of California, San Diego, La Jolla, California 92161, USA; chloeyonemitsu@yahoo.com (C.Y.); aloeffler@ucsd.edu (A.F.); lbode@health.ucsd.edu (L.B.)

* Correspondence: gilberto.kac@gmail.com; Tel.: +55 21-393-865-95

Received: 15 February 2020; Accepted: 8 March 2020; Published: 17 March 2020.

Abstract: Human milk oligosaccharide (HMO) composition varies throughout lactation and can be influenced by maternal characteristics. This study describes HMO variation up to three months postpartum and explores the influences of maternal sociodemographic and anthropometric characteristics in a Brazilian prospective cohort. We followed 101 subjects from 28–35 gestational weeks (baseline) and throughout lactation at 2–8 (visit 1), 28–50 (visit 2) and 88–119 days postpartum (visit 3). Milk samples were collected at visits 1, 2 and 3, and 19 HMOs were quantified using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FL). Friedman post-hoc test, Spearman rank correlation for maternal characteristics and HMOs and non-negative matrix factorization (NMF) were used to define the HMO profile. Most women were secretors (89.1%) and presented high proportion of 2'-fucosyllactose (2'FL) at all three sample times, while lacto-N-tetraose (LNT, 2–8 days) and lacto-N-fucopentaose II (LNFP II, 28–50 and 88–119 days) were the most abundant HMOs in non-secretor women. Over the course of lactation, total HMO weight concentrations (g/L) decreased, but total HMO molar concentrations (mmol/L) increased, highlighting differential changes in HMO composition over time. In addition, maternal pre-pregnancy body mass index (BMI) and parity influence the HMO composition in healthy women in this Brazilian cohort.

Keywords: human milk oligosaccharides; Secretor; lactation; human milk composition; body mass index; HPLC; sialyllactose; fucosyllactose

1. Introduction

Human milk is a conditionally complete food, allowing infants to reach adequate growth and development [1–4]. The paramount benefits for both mother and child health include reduced risk of breast cancer and diabetes for mothers and lower infectious morbidity and mortality for children [5].

The World Health Organization (WHO) has recommended since 2001 the adoption of exclusive breastfeeding for the first six months of life [6,7]. These health benefits have been related to the composition of human milk [8,9].

Human milk is composed of macronutrients (carbohydrates, proteins and fat), micronutrients (vitamins and minerals) and bioactive compounds (cytokines, hormones, growth factors, among others) [8]. Oligosaccharides, part of the carbohydrate fraction, are the 3rd most abundant solid component of human milk (after lactose and fat) [10]. Human milk oligosaccharides (HMOs) are complex unconjugated glycans that are synthesized from lactose, can be elongated by lacto-N-biose or N-acetyllactosamine disaccharide units, and modified by fucose or sialic acid [10]. More than 150 structurally distinct HMOs have been identified, however, less than 20% of HMOs by number comprise approximately 90% of total HMO composition by concentration [11,12]. HMO concentrations range from 20–25 g/L in colostrum to 5–15 g/L in mature milk [10,13,14].

Maternal genetic features play an important role in HMO composition and variation. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the secretor gene, encoding for the enzyme fucosyltransferase-2 (FUT2), and the Lewis gene, encoding for fucosyltransferase-3 (FUT3), contribute a large part to the variation in the HMO composition between different women [15,16]. Women with an active FUT2 enzyme are secretors, whose milk contains a high amount of α 1-2-fucosylated HMOs like 2'-fucosyllactose (2'FL) and lacto-N-fucopentaose I (LNFP I). In contrast, women with specific FUT2 SNPs that introduce a premature stop-codon and abolish the expression of the FUT2 enzyme, are non-secretors and their milk has almost no 2'FL or LNFP I [10,17–19]. In addition to these genetically determined factors, studies have shown that HMO concentrations vary throughout lactation [14,20,21], but also by geographic location, parity, maternal age, weight, body mass index (BMI), mode of delivery and other environmental factors such as seasonality [21–25].

HMOs play important roles in infant health and development outcomes [26–28]. Higher HMO diversity is associated with lower total body weight and lower body fat percentage in children [29]. HMOs can act as substrate for specific and potentially health-promoting bacteria and modulate the infant intestinal microbiota composition [30–33].

Several studies have described the concentrations and variations of HMOs during lactation [20,21,34,35]. However, few investigations have considered a longitudinal design during the first months postpartum and investigated the association between modifiable maternal characteristics and HMO composition. Furthermore, to the best of our knowledge, there are no longitudinal studies during this period in healthy Brazilian or Latin-American women.

This study describes the variation of HMO concentrations at 2–8, 28–50 and 88–119 days postpartum and explores the role of maternal sociodemographic and anthropometric characteristics on HMO composition among healthy women followed in a cohort study in Rio de Janeiro, Brazil.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design and Eligibility Criteria

This study is part of a prospective cohort conducted in a Public Health Care Center in Rio de Janeiro, Brazil. Pregnant women were invited to participate if they met the following eligibility criteria: 18 to 40 years, 28th to 35th weeks of gestation, live in the programmatic area (neighborhood), intended to remain living within the catchment area after the child's birth, free of infectious and chronic diseases (except obesity) and without twin pregnancy.

The recruitment period lasted from January 2017 to April 2019. A non-probabilistic sample was followed at baseline and five visits took place at 3rd trimester of pregnancy (baseline), 2–8 days (visit 1), 28–50 days (visit 2), 88–119 days (visit 3), 6 months (visit 4) and 12 months postpartum (visit 5). Specifically, this manuscript used data and human milk samples from baseline, and 2–8, 28–50 and 88–119 days. Women that developed gestational diabetes, pre-eclampsia or delivered a stillborn were excluded.

The Research Electronic Data Capture (REDCap), an online platform with robust data entry tool, that allows the management of studies with different types of design, was used to collect information and to create a database (<http://project-redcap.org>).

2.2. Human Milk Data and Oligosaccharides Analysis

Human milk samples were collected at 2–8 days, 28–50 and 88–119 days according to the Brazilian Network of Human Milk Banks protocol [36]. The milk was collected preferably in the morning and after breakfast. A general guideline on massage techniques and hand expression of breast milk to prevent breast engorgement and mastitis was provided. Afterwards, the participant was counseled for personal protective equipment use (face protection masks and head cover). The investigators performed the same procedures and used nitrile gloves without talcum powder, which reduces the possibility of samples contamination [37]. Investigators were available to assist participants at the time of collection whenever needed.

The mother performed manual milk extractions directly in 50 mL sterile, ribonuclease (RNase) and deoxyribonuclease (DNase)-free and non-pyrogenic falcon tubes. At 2–8 days, 5 mL of milk were collected, and were later divided into 5 aliquots of 1 mL. At 28–50 and 88–119 days, 17 mL were collected, which were subdivided into 1 aliquot of 5 mL and 12 aliquots of 1 mL. The samples were processed immediately after collection. Human milk was stored in sterile, RNase and DNase-free and non-pyrogenic tubes; refrigerated at -20 °C, transported in a temperature-controlled box (-1 °C to -5 °C), and finally stored in a freezer at -80 °C until analysis.

The samples were shipped to the University of California, San Diego on dry ice in a thermal box to ensure that temperatures were kept close to -80 °C. High-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FL) was used to characterize HMOs in breast milk, as previously described [38]. Human milk was spiked with raffinose (a non-HMO carbohydrate) as an internal standard to allow for absolute quantification. Oligosaccharides were extracted by high-throughput solid phase extraction over C18 and Carbograph microcolumns and fluorescently labeled with 2-aminobenzamide (2AB). Labeled oligosaccharides were analyzed by HPLC-FL on an amide-80 column (15 cm length, 2 mm inner diameter, 3 µm particle size; Tosoh Bioscience) with a 50 mmol/L ammonium formate-acetonitrile buffer system. Separation was performed at 25 °C and monitored with a fluorescence detector at 360 nm excitation and 425 nm emission. Peak annotation was based on standard retention times and mass spectrometric analysis on a Thermo LCQ Duo Ion trap mass spectrometer, equipped with a Nano-ESI-source. The absolute quantification of the following 19 HMOs was determined based on individual standard response curves and in relation to the internal raffinose standard: 2'FL, 3-fucosyllactose (3FL), 3'-sialyllactose (3'SL), 6'-sialyllactose (6'SL), difucosyllactose (DFLac), difucosyllacto-N-hexaose (DFLNH), difucosyllacto-N-tetrose (DFLNT), disialyllacto-N-hexaose (DSLNH), disialyllacto-N-tetraose (DSLNT), fucodisialyllacto-N-hexaose (FDSLNH), fucosyllacto-N-hexaose (FLNH), lacto-N-fucopentaose (LNFP) I, LNFP II, LNFP III, lacto-N-hexaose (LNH), lacto-N-neotetraose (LNnT), lacto-N-tetrose (LNT), sialyl-lacto-N-tetraose b (LSTb), and sialyl-lacto-N-tetraose c (LSTc). Secretor status was determined by presence or near-absence of 2'FL and LNFP I [22,23].

HMO-bound sialic acid and HMO-bound fucose were calculated as the sum of all sialic acid and fucose moieties bound to the measured HMOs, respectively. Small HMOs were defined by grouping 2'FL, 3FL, 3'SL and 6'SL concentrations. We considered the HMOs extended structures type I (Gal (β1-3) GlcNAc, LactoN-biose) and type II (Gal (β1-4) GlcNAc, N-Acetyllactosamine), to classify these groups: type 1 was calculated with sum of LNT, LNFP I, LNFP II, LSTb and DSLNT and type 2 with LNnT, LNFP III and LSTc. The alpha linkages groups were classified as fucosylated, with Alpha 1,2 (LNFP I and 2'FL) or Alpha 1,3 (LNFP III and 3-fucosyllactose), or as sialylated Alpha 2,6 (LSTc and 6'SL) [39,40].

2.3. Co-Variables

Maternal height was measured with a stadiometer (Altura Exata, Belo Horizonte, Brazil), and weight, with weighing scales (Seca 704, Hamburg, Germany). Pre-pregnancy BMI [weight(kg)/height (m)²] was calculated using self-reported pre-pregnancy weight and measured height (at 28–50 days) and was categorized as underweight (<18.5 kg/m²), normal weight (18.5–24.9 kg/m²), overweight (25.0–29.9 kg/m²) and obesity (\geq 30.0 kg/m²). Gestational age at birth was based on the first ultrasound, performed prior to 22 ($n = 98$) or 24 ($n = 1$) gestational weeks, or the date of the last menstrual period ($n = 2$) [41].

Gestational weight gain (GWG) was calculated by means of the difference between weight at the last prenatal visit and pre-pregnancy weight (self-reported or retrieved from the prenatal care booklet). The supplements used during pregnancy, and sociodemographic information (maternal age, education and parity) were self-reported and obtained using structured questionnaires. The breastfeeding status was classified according to the WHO definitions [42].

The study was approved by the Research Ethics Committees of the Municipal Secretariat of Health and Civil Defense of the State of Rio de Janeiro (Protocol number: 49218115.0.0000.5275) and of Maternity School of Rio de Janeiro Federal University (Protocol number: 49218115.0.0000.5275), and was carried out following the rules of the Declaration of Helsinki of 1975. Written consent from all participants was obtained freely and spontaneously, after all necessary clarifications were provided.

2.4. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with R software, version 3.6 [43]. The variables distribution was evaluated by histograms, skewness and kurtosis measures and a Shapiro–Wilk test (stats package). Outlier values of HMOs concentration were not excluded. Median and interquartile ranges were used to describe maternal sociodemographic and anthropometric characteristics, HMO concentrations and alpha diversity. A Mann–Whitney test was performed in order to evaluate differences between women with and without milk samples. For HMO's components and variations in HMO group throughout lactation, Friedman's test and post-hoc analysis for multiple comparisons were performed (using a pairwise multiple comparison of mean ranks—PMCMR package), and a significance level <0.05.

For exploratory analysis, a Spearman rank correlation with heat maps (Corrplot Package) was performed to investigate the correlation between maternal characteristics (age, education, parity, gestational age at birth, GWG, pregnancy iron and folic acid supplement and pre-pregnancy weight, pre-pregnancy BMI) and HMO individuals' concentrations and alpha diversity index at the different time points. For these analyses, a significance level of <0.01 was adopted and correlations levels were interpreted as: 0.00 to 0.19—very weak correlation, 0.20 to 0.39—weak correlation, 0.40 to 0.69—moderate correlation, 0.70 to 0.89—strong correlation and 0.90 to 1.00—very strong correlation [44].

A stacked bar chart plot (ggplot2 package) was derived to present an absolute concentration and relative abundance of HMOs. The α-diversity index was calculated using Shannon diversity and evenness, inverse Simpson and Pielou evenness (biodiversity R package and vegan package). For index of diversity and evenness comparison in follow-up visits, a Friedman post-hoc test for multiple comparisons was performed.

Non-metric multidimensional scaling (NMDS) was used to define the number of dimensions, preserving the differences to explore patterns of HMO profiles, using the Bray–Curtis dissimilarity matrix (metaMDS in the vegan and ggplot2 package). Subsequently, an analysis of the main components of HMO profiles was performed using the Brunet method, which identified three basic components retained based on the classification estimate. The non-negative matrix factorization (NMF) was used to define potential patterns in the HMO profile data according to postpartum period, BMI nutritional status, parity, and maternal age. The HMO with the highest value on NMF represents the highest probability of that compound contributing to the HMO profile.

Sensitivity analyses were performed using only a subset of 15 women with samples in all time periods.

3. Results

3.1. Participants and HMOs Concentrations

A total of 322 women were screened and 147 were recruited. However, 46 women did not collect breast milk samples for the following reasons: 31 missed the visit, 5 failed to collect the samples, 4 women did not breastfeed, 2 collected samples after the predefined time frame of the visit, 3 were excluded (gestational diabetes, pre-eclampsia and delivered a stillborn) and 1 refused to collect. Thus, 101 participants collected milk samples: 52 at 2–8 days (visit 1), 75 at 28–50 days (visit 2) and 46 at 88–119 days (visit 3). Overall, 15 participants had samples for all time points, 42 had samples at two visits and 44 for one visit (Figure 1).

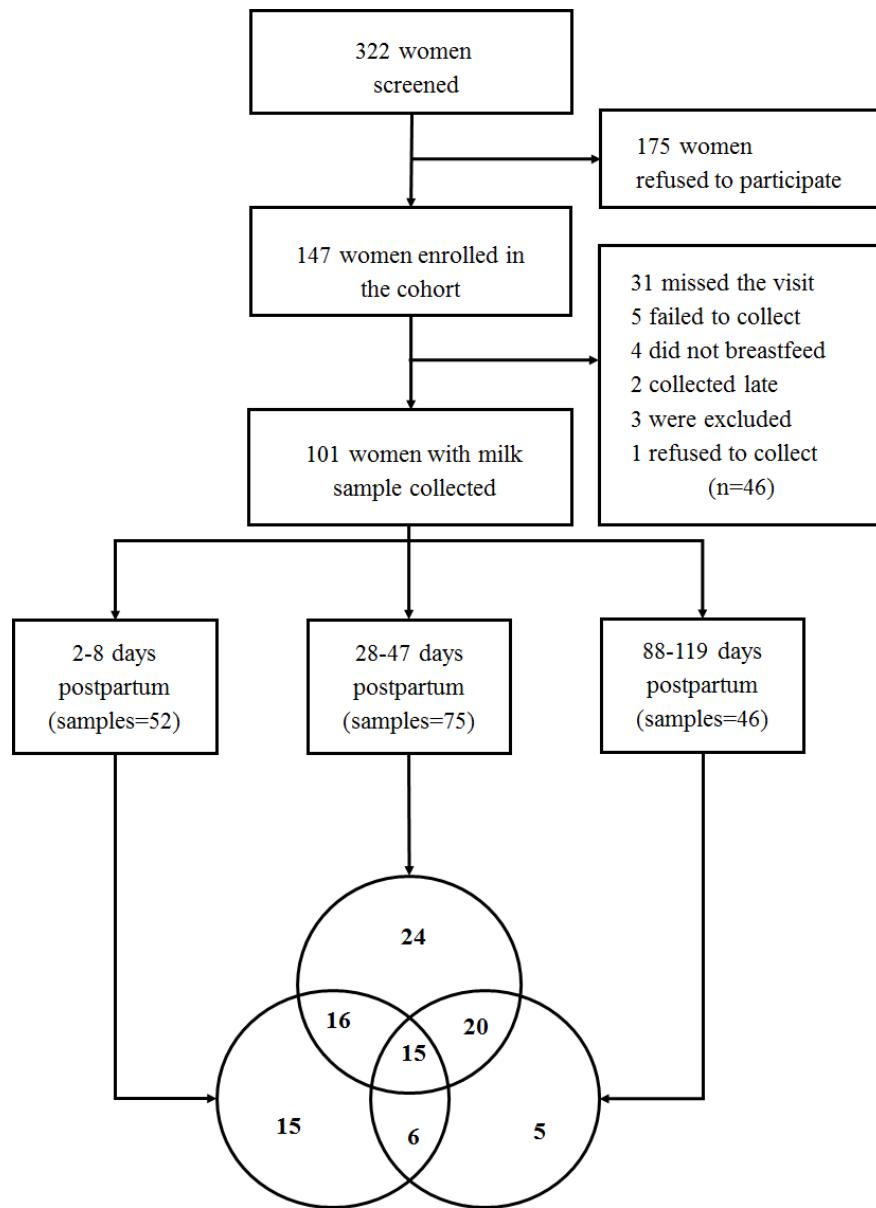


Figure 1. Flow of women and human milk samples of the Brazilian cohort, totaling 101 women with 174 milk samples. The flow intersection represents the women with samples in two or more follow-up visits.

Overall, 89.1% ($n = 89$) of the women were identified as secretors and 10.9% ($n = 11$) as non-secretors. At 2–8 days, 90.4% of mothers were exclusively breastfeeding ($n = 47$) and 9.6% were using

infant feeding formulas ($n = 5$). At 28–50 days 67.6% of mothers were exclusively breastfeeding ($n = 49$), 20.3% used infant feeding formulas ($n = 15$), 9.5% were predominantly breastfeeding ($n = 7$) and 2.7% ($n = 2$) were in complementary breastfeeding. At 88–119, 55.8% of mothers were exclusively breastfeeding ($n = 24$), 30.2% used infant formula feeding ($n = 13$) and 14.0% were predominantly breastfeeding ($n = 6$). No differences were observed when comparing women with and without milk samples (Table 1).

Table 1. Demographic and anthropometric profile and supplement use of women from the Brazilian cohort, Rio de Janeiro, Brazil.

| Variables | Participants | | | | | | | |
|---|----------------------------|------------------------|------------------------|------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------|
| | With Samples ($n = 101$) | | | | Without Samples ($n = 46$) | | | |
| | Median | IQR | Mean | SD | Median | IQR | Mean | SD |
| Maternal age (years) ¹ | 26.1 | 22.8–31.6 | 27.2 | 5.5 | 27.8 | 22.8–30.4 | 26.9 | 5.4 |
| Education (years) ¹ | 12.0 | 10.0–12.0 | 10.9 | 2.8 | 10.5 | 8.2–12.0 | 10.5 | 2.6 |
| Parity (livebirths) ¹ | 0.0 | 0.0–1.0 | 0.7 | 0.8 | 0.5 | 0.0–1.0 | 0.8 | 1.1 |
| Pre-pregnancy weight (kg) ² | 63.0 | 55.0–72.0 | 65.1 | 14.8 | 61.5 ⁵ | 57.2–70.1 ⁵ | 64.2 ⁵ | 14.0 ⁵ |
| Gestational age at birth (weeks) | 39.4 | 38.9–40.6 | 39.5 | 1.4 | 39.7 ⁶ | 39.1–40.4 ⁶ | 39.5 ⁶ | 1.5 ⁶ |
| Gestational weight gain (kg) | 12.4 | 8.6–15.5 | 12.4 | 6.2 | 11.7 ⁷ | 8.7–18.0 ⁷ | 12.8 ⁷ | 7.9 ⁷ |
| Pre-pregnancy body mass index (BMI) (kg/m ²) ³ | 24.4 ⁴ | 21.3–28.8 ⁴ | 25.7 ⁴ | 5.7 ⁴ | 22.9 ⁸ | 21.8–29.6 ⁸ | 24.7 ⁸ | 4.9 ⁸ |
| <i>n (%)</i> | | | | | | | | |
| Pre-pregnancy BMI categories (kg/m ²) | | | | | | | | |
| Underweight (<18.5) | | | 3 (3.2) ⁴ | | | | 1 (6.7) ⁸ | |
| Normal weight (18.5–24.9) | | | 48 (50.5) ⁴ | | | | 8 (53.3) ⁸ | |
| Overweight (≥ 25.0) | | | 44 (46.3) ⁴ | | | | 6 (40.0) ⁸ | |
| Iron supplement use (yes) ⁹ | | | 39 (42.9) | | | | 15 (35.7) | |
| Folic acid supplement (yes) ⁹ | | | 79 (87.8) | | | | 40 (95.2) | |

Note: IQR: interquartile range. Data of the participants with and without samples were not different according to Mann–Whitney, $P < 0.05$. ¹Baseline information. ²Pre-pregnancy weight was self-reported. ³Pre-pregnancy body mass index (BMI) was calculated with measured height at 28–50 days postpartum and pre-pregnancy weight. ⁴Due to missing data, $n = 95$. ⁵Due to missing data, $n = 44$. ⁶Due to missing data, $n = 35$. ⁷Due to missing data, $n = 41$. ⁸Due to missing data, $n = 15$. ⁹During pregnancy.

The median of total HMO concentrations for all women was 16.66 mmol/L (12.5 g/L) for 2–8 days, 15.48 mmol/L (11.5 g/L) for 28–50 days and 16.79 mmol/L (11.3 g/L) for 88–119 days. Total HMO concentration at 88–119 days was significantly higher than at 2–8 days ($p \leq 0.05$) and 28–50 days ($p \leq 0.05$) and was influenced by 3FL and LNFP II (Table 2). The total HMOs concentration according to secretor status through lactation could be found at supplementary table S1.

Table 2. Time variation of human milk oligosaccharides (HMOs) concentrations in all women in the Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil ($n = 101$).

| HMOs | All Women—Median (IQR) (mmol/L) | | |
|---|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| | Days Postpartum (n) | | |
| | 2–8 (n = 52) | 28–50 (n = 75) | 88–119 (n = 46) |
| Fucosylated or Sialylated Lactose | | | |
| 2'FL | 5.04 (4.02–6.48) | 5.04 (3.31–5.85) | 4.26 (2.96–6.16) |
| 3FL | 0.27 ^b (0.19–0.45) | 0.36 ^c (0.25–0.84) | 1.88 ^{bc} (0.39–5.29) |
| DFLac | 0.25 ^{ab} (0.17–0.35) | 0.37 ^{ac} (0.27–0.49) | 0.44 ^{bc} (0.37–0.57) |
| 3'SL | 0.32 ^b (0.23–0.43) | 0.38 ^c (0.28–0.60) | 0.54 ^{bc} (0.43–0.70) |
| 6'SL | 0.37 ^{ab} (0.22–0.58) | 0.63 ^{ac} (0.48–0.94) | 0.49 ^{bc} (0.37–0.74) |
| Non-Fucosylated, Non-Sialylated HMOs | | | |
| LNT | 1.40 (1.08–2.27) | 1.45 (1.04–2.00) | 1.36 (1.03–1.71) |
| LNnT | 0.58 ^b (0.30–1.18) | 0.28 ^c (0.18–0.42) | 0.33 ^{bc} (0.17–0.58) |
| LNH | 0.06 ^{ab} (0.03–0.11) | 0.08 ^{ac} (0.06–0.14) | 0.07 ^{bc} (0.04–0.09) |
| Fucosylated, Non-Sialylated HMOs | | | |
| LNFP I | 2.66 ^b (2.04–3.48) | 1.56 ^c (0.85–2.36) | 0.76 ^{bc} (0.47–1.58) |
| LNFP II | 0.77 ^{ab} (0.60–1.08) | 1.12 ^{ac} (0.90–1.58) | 1.69 ^{bc} (1.42–2.26) |
| LNFP III | 0.08 ^b (0.07–0.12) | 0.07 ^c (0.05–0.10) | 0.04 ^{bc} (0.02–0.06) |
| DFLNT | 1.47 ^b (0.62–1.81) | 1.42 ^c (0.87–1.80) | 1.20 ^{bc} (0.93–1.57) |
| FLNH | 0.11 ^{ab} (0.05–0.16) | 0.13 ^{ac} (0.08–0.22) | 0.10 ^{bc} (0.07–0.14) |
| DFLNH | 0.13 (0.05–0.21) | 0.16 (0.09–0.25) | 0.12 (0.04–0.21) |
| Non-Fucosylated, Sialylated HMOs | | | |
| LSTb | 0.09 (0.07–0.12) | 0.11 (0.07–0.15) | 0.07 (0.05–0.11) |
| LSTc | 0.77 ^b (0.63–0.96) | 0.27 ^c (0.18–0.35) | 0.10 ^{bc} (0.07–0.15) |
| DSLNT | 0.58 ^b (0.38–0.74) | 0.30 ^c (0.10–0.41) | 0.18 ^{bc} (0.03–0.30) |
| DSLNH | 0.22 ^{ab} (0.11–0.27) | 0.22 ^{ac} (0.15–0.33) | 0.09 ^{bc} (0.05–0.13) |
| Fucosylated, Sialylated HMOs | | | |
| FDSLNH | 0.06 ^{ab} (0.04–0.12) | 0.17 ^{ac} (0.09–0.31) | 0.16 ^{bc} (0.09–0.24) |
| Total | 16.6 ^b (15.66–17.36) | 15.48 ^c (14.73–16.42) | 16.79 ^{bc} (15.09–17.43) |

Note: IQR: interquartile range. ^a indicates that the HMO concentration at visit 1 is significantly different ($p < 0.05$) from the concentration at visit 2, ^b indicates that the HMO concentration at visit 1 is significantly different ($p < 0.05$) from the concentration at visit 3 and ^c indicates that the HMO concentration at visit 2 is significantly different ($p < 0.05$) from the concentration at visit 3 according to Friedman post-hoc test. DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-N-tetraose; FDSLNH, fucodisialyllacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNnT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetrose; LSTb, sialyl-lacto-N-tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3FL, 3-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose.

Additionally, concerning HMOs grouping, the milk produced at 88–119 days presented a lower median concentration of HMO-bound sialic acid (2.41 mmol/L), type 1 (4.60 mmol/L), type 2 (0.50 mmol/L) and Alpha 2,6 (0.70 mmol/L) compared with 2–8 days and 28–50 days ($p \leq 0.05$). In contrast, the median of HMO-bound fucose (15.04 mmol/L), small HMO group (8.58 mmol/L) and Alpha 1,2 (1.90 mmol/L) were the highest at 88–119 days compared with 2–8 days and 28–50 days ($p \leq 0.05$), showing that in later stages, a higher number of smaller molecules was observed (Table 3).

Table 3. Time variations in HMO group concentrations in women from the Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil (*n* = 101).

| Variable (mmol/L) | All Women | | | Secretors Women | | | Non-Secretors Women | | | | | | | | |
|--|------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-------------|-------------|--|--|--|--|--|--|
| | Days Postpartum (<i>n</i>) | | | | | | | | | | | | | | |
| | Median (IQR) | | | | | | | | | | | | | | |
| HMO-Bound Sialic Acid | 3.45 ^a | 3.14 ^{ac} | 2.40 ^c | 3.45 ^x | 3.00 ^{xz} | 2.39 ^z | 3.33 | 3.85 | 2.61 | | | | | | |
| (All sialic acid moieties bound to HMOs) | (3.07–3.90) | (2.64–3.64) | (1.97–2.88) | (3.08–3.88) | (2.64–3.55) | (1.92–2.88) | (3.08–3.85) | (3.04–4.14) | (2.34–2.89) | | | | | | |
| HMO-Bound Fucose | 13.59 ^b | 13.436 ^c | 15.04 ^{bc} | 13.68 ^y | 13.63 ^z | 15.29 ^{yz} | 3.77 | 5.26 | 8.09 | | | | | | |
| (All fucose moieties bound to HMOs) | (12.63–14.67) | (11.86–14.48) | (12.91–16.00) | (12.84–14.97) | (12.42–14.58) | (13.22–16.09) | (3.26–4.25) | (3.82–5.60) | (7.39–9.12) | | | | | | |
| Small HMOs | 6.26 ^b | 6.97 ^c | 8.58 ^{bc} | 6.66 | 7.11 | 8.86 | 0.50 | 1.53 | 1.84 | | | | | | |
| (2'FL + 3FL + 3'SL + 6'SL) | (4.77–7.90) | (5.79–7.96) | (7.38–10.54) | (5.38–8.09) | (6.22–8.11) | (7.63–10.87) | (0.46–0.92) | (0.83–1.74) | (1.42–3.58) | | | | | | |
| Type 1 | 5.80 ^a | 4.95 ^{ac} | 4.60 ^c | 5.73 ^x | 4.92 ^{xz} | 4.50 ^z | 6.26 | 5.14 | 4.73 | | | | | | |
| (LNt + LNFP I + LNFP II + LSTb + DSLNT) | (5.30–6.58) | (4.14–5.93) | (3.91–5.44) | (5.30–6.48) | (4.15–5.94) | (3.78–5.48) | (5.85–6.97) | (4.46–5.69) | (4.43–4.98) | | | | | | |
| Type 2 | 1.51 ^a | 0.65 ^{ac} | 0.50 ^c | 1.51 ^x | 0.65 ^{xz} | 0.55 ^z | 1.40 | 0.65 | 0.34 | | | | | | |
| (LNnT + LNFP III + LSTc) | (1.19–1.94) | (0.48–0.84) | (0.29–0.70) | (1.20–1.96) | (0.49–0.83) | (0.31–0.76) | (1.19–1.65) | (0.43–0.93) | (0.24–0.45) | | | | | | |
| Alpha 1,2 | 7.94 | 6.67 | 5.36 | 8.66 ^x | 6.98 ^{xz} | 5.53 ^z | 0.12 | 0.14 | 0.17 | | | | | | |
| (LNFP I + 2'FL) | (5.87–9.80) | (4.81–8.23) | (3.80–7.21) | (7.23–10.11) | (5.59–8.37) | (4.22–7.84) | (0.09–0.13) | (0.12–0.18) | (0.14–0.18) | | | | | | |
| Alpha 1,3 | 0.37 ^b | 0.44 ^c | 1.90 ^{bc} | 0.38 ^y | 0.46 ^z | 2.27 ^{yz} | 0.22 | 0.24 | 1.07 | | | | | | |
| (LNFP III + 3FL) | (0.28–0.55) | (0.32–0.92) | (0.42–5.30) | (0.30–0.55) | (0.34–1.02) | (0.42–5.30) | (0.14–0.26) | (0.20–0.37) | (0.72–2.70) | | | | | | |
| Alpha 2,6 | 1.28 ^a | 0.92 ^{ac} | 0.60 ^c | 1.29 ^x | 0.935 ^x | 0.61 | 0.92 | 0.82 | 0.46 | | | | | | |
| (LSTc + 6'SL) | (0.97–1.68) | (0.78–1.27) | (0.50–0.87) | (1.00–1.68) | (0.79–1.27) | (0.53–0.87) | (0.65–1.50) | (0.53–1.15) | (0.34–0.65) | | | | | | |

Note: IQR: interquartile range. ^a indicates that the HMO concentration at visit 1 is significantly different (*p* < 0.05) from the concentration at visit 2, ^b indicates that the HMO concentration at visit 1 is significantly different (*p* < 0.05) from the concentration at visit 3 and ^c indicates that the HMO concentration at visit 2 is significantly different (*p* < 0.05) from the concentration at visit 3 according to Friedman post-hoc test. DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-N-tetraose; FDSLNH, fucodisialyllacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNnT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetrose; LSTb, sialyl-lacto-N-tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3FL, 3-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose.

Notably, 2'FL was the most abundant HMO in the milk of secretor women with 32.2% abundance at 2–8 days, 33.8% at 28–50 days, and 25.2% at 88–119 days. In comparison and per definition, 2'FL was nearly absent in the milk of non-secretor women. Instead, LNT was the most abundant HMO at 2–8 days with (30.1%) and LNFP II was the most abundant HMO at 28–50 days (29.4%) and 88–119 days (38.4%) (Figure 2).

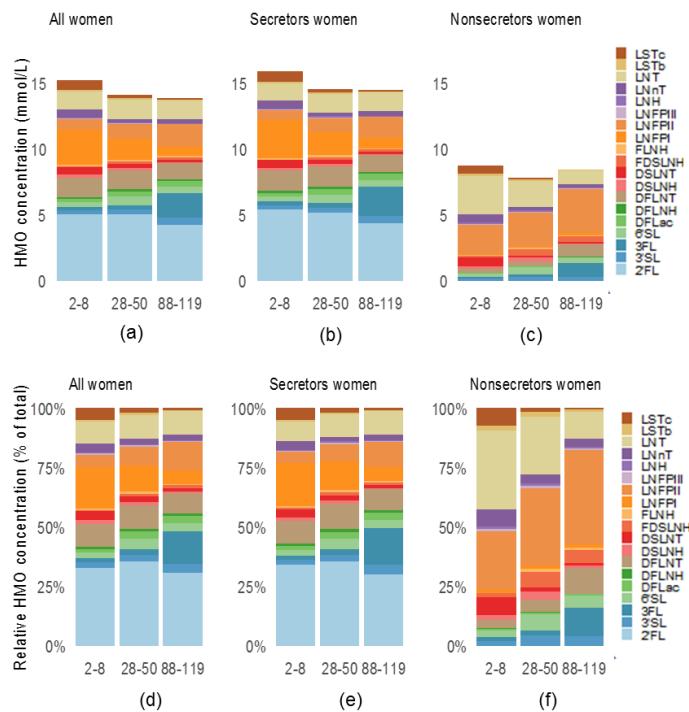


Figure 2. HMO absolute and relative abundance of women from the Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil.

Note: Median of absolute total HMO (mmol/L) (**a,b** and **c**) at 2–8, 28–50 and 88–119 days and relative abundance (**d,e** and **f**) at 2–8, 28–50 and 88–119 days concentrations of all women, according secretor status and follow-up points. DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-N-tetraose; FDSLNH, fucodisialyllacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNNT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetrose; LSTb, sialyl-lacto-N-tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3FL, 3-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6SL, 6'-sialyllactose.

Significant differences in HMO concentrations between secretor and non-secretor women ($p \leq 0.05$) were observed for almost all HMOs except 6'-SL, DSLNH, DSLNT, FLNH, LNFP III, LNH and LNNT at one or more visits. Among secretor women, the HMOs 3FL (2.24 mmol/L), 3'SL (0.56 mmol/L), DFLac (0.45 mmol/L) and LNFP II (1.55 mmol/L) presented higher values at 88–119 days in comparison with other visits (Figure 3).

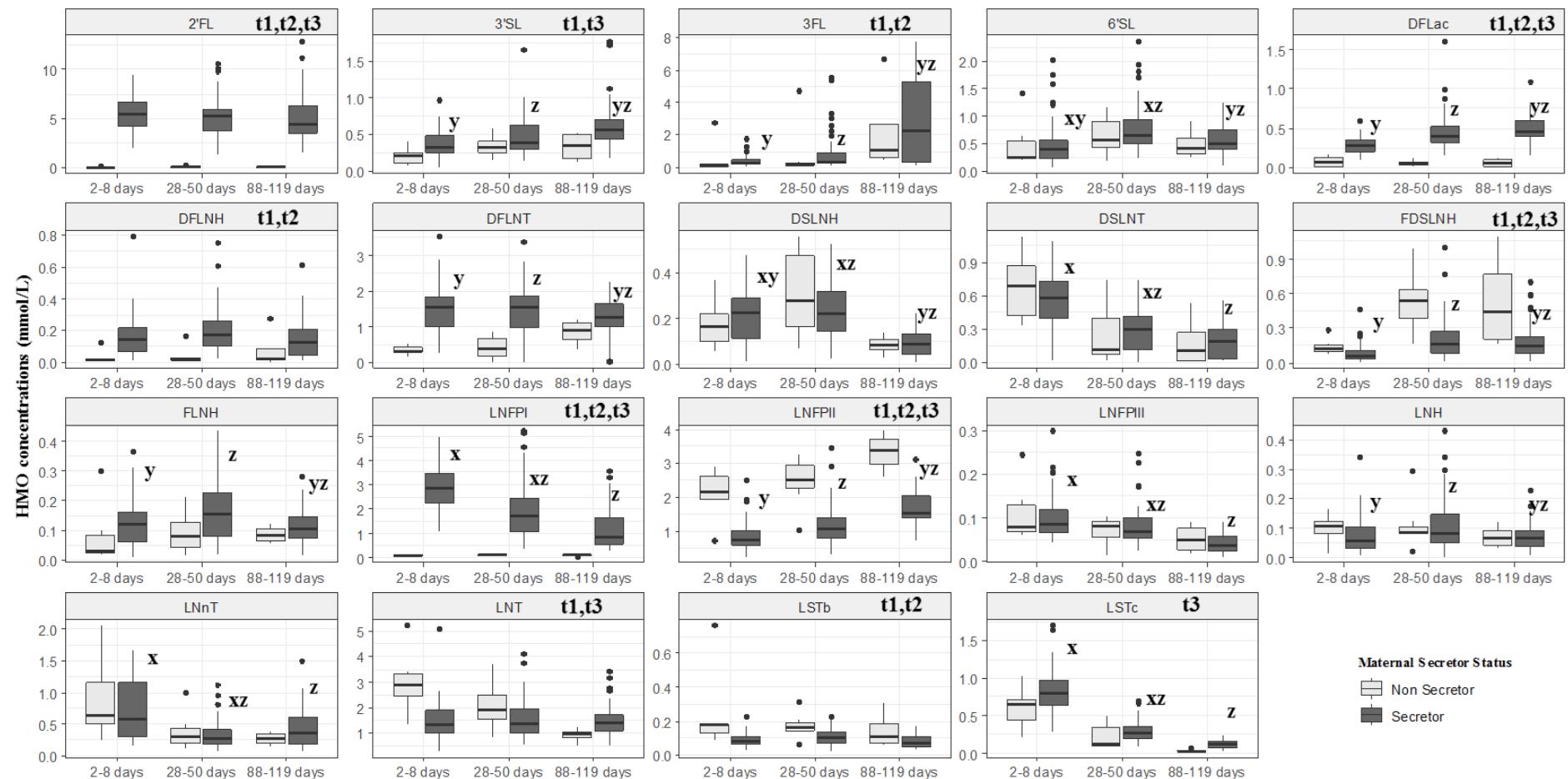


Figure 3. Box plot of secretor and non-secretor HMOs concentration of women from Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil.

Note: The description t1, t2 and t3 indicate differences between secretor and non-secretor concentration of according to Mann-Whitney, $P < 0.05$ for each time. . x indicates that the HMO concentration at visit 1 is significantly different ($p < 0.05$) from the concentration at visit 2, y indicates that the HMO concentration at visit 1 is significantly different ($p < 0.05$) from the concentration at visit 3 and z indicates that the HMO concentration at visit 2 is significantly different ($p < 0.05$) from the concentration at visit 3 according to Friedman post-hoc test. A comparison between the times of non-secretor women was not performed.

3.2. Relations between Maternal Anthropometric, Demographic and Reproductive Characteristics and HMO Compositions Concentrations

Spearman correlations varied between low and moderate values. Parity was directly correlated with LNFP II (0.4), DFLNT (0.4), LNH (0.4) and FDSLNH (0.4) at 2–8 days. Pre-pregnancy weight was inversely correlated with 3FL (-0.5), LNFP III (-0.4) and DFLNH (-0.4) and directly correlated with LNnT (0.4) at 2–8 days; inversely correlated with LNFP III (-0.4) and DFLNH (-0.4) at 28–50 days and inversely correlated with 3FL (-0.5) at 88–119 days. Pre-pregnancy BMI was inversely correlated with LNFP III (-0.4) and DFLNH (-0.4) and directly correlated with LNnT (0.4) at 2–8 days; inversely correlated with LNFP III (-0.4) and DFLNH (-0.4) at 28–50 days and inversely correlated with DFLNH (-0.4) and directly correlated with LNnT (0.4) at 88–119 days (Figure 4, 5 and 6).

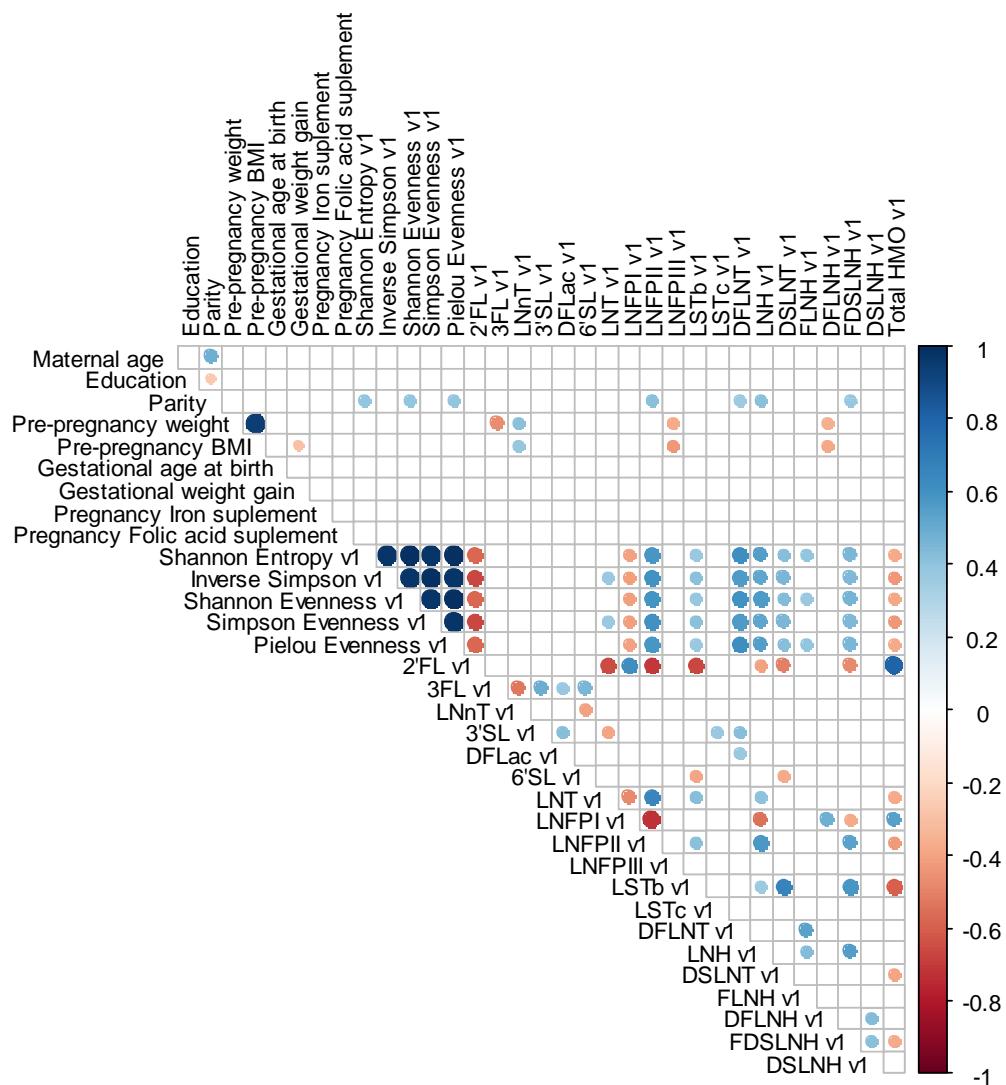


Figure 4. Spearman rank correlations between maternal demographic, anthropometric, reproductive and supplementary variables and individual HMO concentration in mmol/L and diversity and evenness at 2–8 days. **Note:** The circle only becomes visible for the correlations that present a level of significance ≤ 0.01 . The blue color indicates a positive and the red color a negative correlation. BMI: body mass index; DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-N-tetraose; FDSLNH, fucodisialyllacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNnT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetraose; LSTb, sialyl-lacto-N-tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3FL, 3-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose.

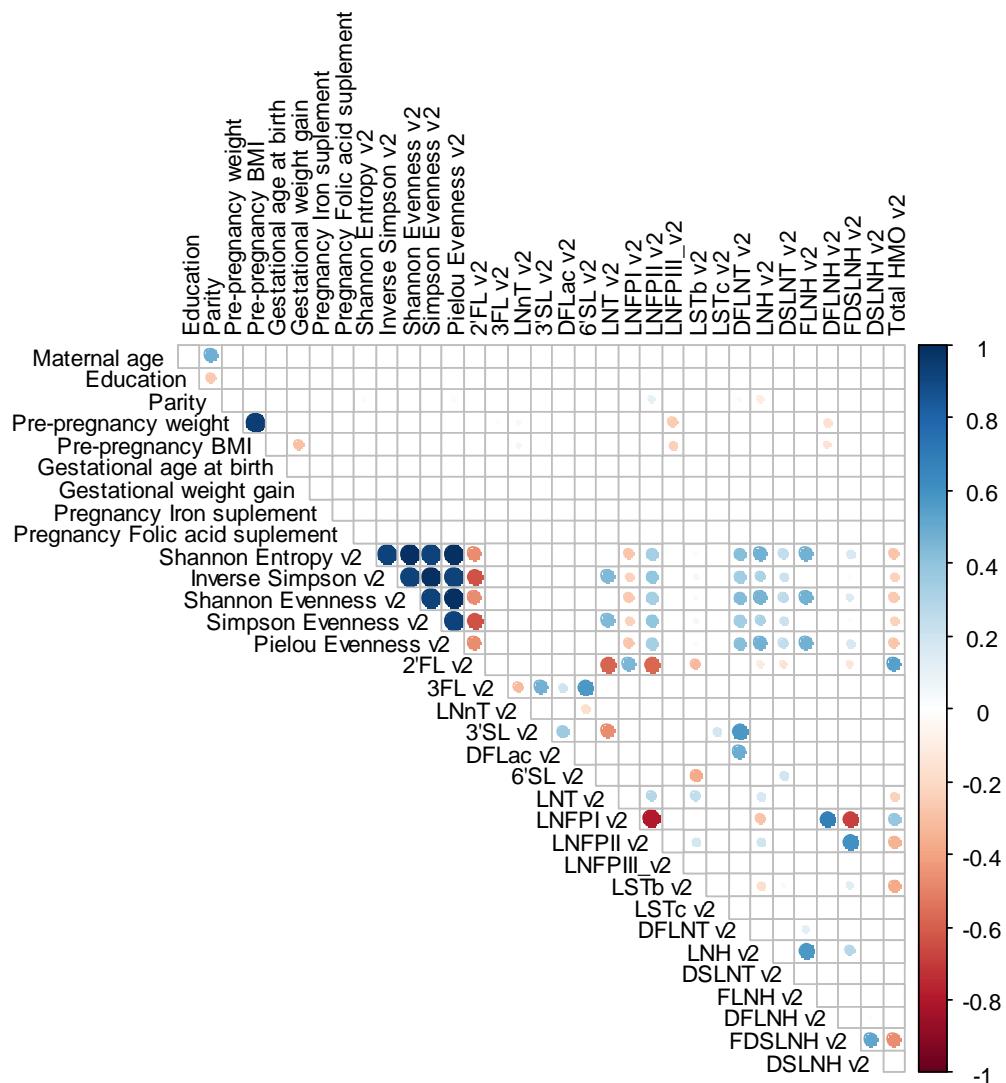


Figure 5. Spearman rank correlations between maternal demographic, anthropometric, reproductive and supplementary variables and individual HMO concentration in mmol/L and diversity and evenness at 28-50 days.

Note: The circle only becomes visible for the correlations that present a level of significance ≤ 0.01 . The blue color indicates a positive and the red color a negative correlation. BMI: body mass index; DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-N-tetraose; FDSLNH, fucodisialyllacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNNT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetrose; LSTb, sialyl-lacto-N-tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3FL, 3-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose.

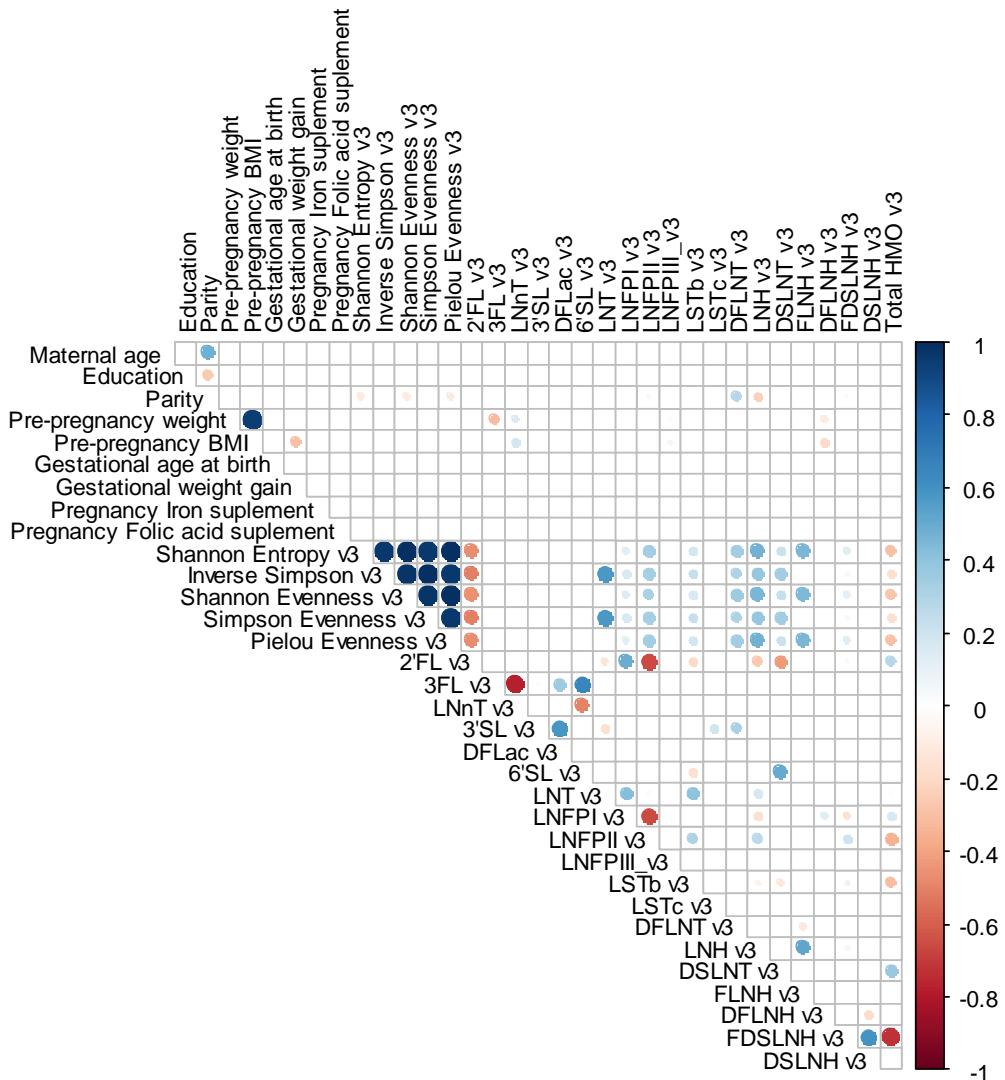


Figure 6. Spearman rank correlations between maternal demographic, anthropometric, reproductive and supplementary variables and individual HMO concentration in mmol/L and diversity and evenness at 88–119 days.

Note: The circle only becomes visible for the correlations that present a level of significance ≤ 0.01 . The blue color indicates a positive and the red color a negative correlation. BMI: body mass index; DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-N-tetraose; FDSLNH, fucodisialyllacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNnT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetrose; LSTb, sialyl-lacto-N-tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3FL, 3-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose.

3.3. HMO Diversity and Evenness

The milk produced at 28–50 days presented the highest diversity (Shannon entropy index) and evenness (Shannon and Pielou evenness indexes), with higher median values of indexes compared to the other visits. Additionally, the milk produced in the last visit presented the lowest median for the same indexes of diversity and evenness (Table 4).

Table 4. Variation in HMO diversity and evenness indexes among women from Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil.

| Indexes | Follow Up Visits in Days Postpartum | | |
|------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | 2–8 (<i>n</i> = 52) | 28–50 (<i>n</i> = 75) | 88–119 (<i>n</i> = 46) |
| Shannon entropy | 2.152 ^{ab} (2.042–2.239) | 2.236 ^{ac} (2.111–2.295) | 2.073 ^{bc} (1.988–2.189) |
| Inverse Simpson | 5.764 (4.778–6.671) | 5.890 (4.992–6.934) | 5.310 (4.525–6.238) |
| Shannon evenness | 0.730 ^{ab} (0.697–0.760) | 0.760 ^{ac} (0.715–0.780) | 0.700 ^{bc} (0.673–0.740) |
| Simpson evenness | 0.303 (0.251–0.351) | 0.310 (0.263–0.365) | 0.279 (0.238–0.328) |
| Pielou evenness | 0.731 ^{ab} (0.694–0.760) | 0.759 ^{ac} (0.717–0.780) | 0.704 ^{bc} (0.675–0.744) |

Note: All values are median and interquartile range. HMO: human milk oligosaccharide. ^a indicates that the HMO concentration at visit 1 is significantly different ($p < 0.05$) from the concentration at visit 2, ^b indicates that the HMO concentration at visit 1 is significantly different ($p < 0.05$) from the concentration at visit 3 and ^c indicates that the HMO concentration at visit 2 is significantly different ($p < 0.05$) from the concentration at visit 3 according to Friedman post-hoc test.

3.4. HMO Profiles (NMF)

The components that most contributed to HMO profiles at 2–8 days, 28–50 days, and 88–119 days were LNFP II, 3FL and 2'FL, respectively. For all women, the major contribution derived from LNnT (Table 5) and also for age, except the third quartile (Table 6).

3'SL was the HMO that most contributed to the profile of women with pre-pregnancy underweight, while LSTc contributed more for those with normal weight and 2'FL represented the highest contribution for overweight and obese women (Table 7). Overall, 2'FL contributed the most to the HMO profile in women with ≤ 1 child while LNnT contributed the most to the HMO profile in women with two or more children, according to baseline information (Table 8).

3.5. Sensitivity Analyses with Women with Samples in All Time Periods (*n* = 15)

The majority of the results derived from the sensitivity analyses confirm the findings observed on the complete dataset, such as the smaller total HMO concentration at last visit in g/L, obese women with 2'fucosylactose as the main contributor to the HMO profile and major HMO diversity and evenness at visit 2 (data not shown). However, some minor differences were found. The most abundant HMO on non-secretor women in this subset on the last visit was different from the complete dataset (3-syallactose). Spearman rank significant correlations were observed between maternal age and FLNH at visit 2 and 3. Finally, maternal characteristics, such as primiparity and normal weight and excess weight, showed a different main contributor HMO in the subgroup, when compared with the complete dataset results.

Table 5. NMF scores according to time—postpartum period and general (for all times) for individual HMOs.

| HMOs | Days Postpartum | | | |
|---|----------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| | 2–8 (<i>n</i> = 52) | 28–50 (<i>n</i> = 75) | 88–119 (<i>n</i> = 46) | All Women (<i>n</i> = 101) |
| Fucosylated or Sialylated Lactose | | | | |
| 2'FL | 0.38 | 0.37 | 1.00 | 0.80 |
| 3FL | 0.36 | 0.74 | 0.89 | 0.01 |
| DFLac | 0.03 | 0.06 | 0.10 | 0.02 |
| 3'SL | 0.05 | 0.15 | 0.03 | 0.01 |
| 6'SL | 0.42 | 0.12 | 0.10 | 0.29 |
| Non-Fucosylated, Non-Sialylated HMOs | | | | |
| LNT | 0.48 | 0.27 | 0.03 | 0.14 |
| LNnT | 0.37 | 0.04 | 0.41 | 0.89 |
| LNH | 0.38 | 0.11 | 0.13 | 0.28 |
| Fucosylated, Non-Sialylated HMOs | | | | |
| LNFP I | 0.41 | 0.62 | 0.76 | 0.43 |
| LNFP II | 0.53 | 0.30 | 0.16 | 0.14 |
| LNFP III | 0.03 | 0.04 | 0.09 | 0.70 |
| DFLNT | 0.44 | 0.51 | 0.45 | 0.46 |
| FLNH | 0.10 | 0.05 | 0.01 | 0.43 |
| DFLNH | 0.27 | 0.38 | 0.38 | 0.35 |
| Fucosylated, Non-Sialylated HMOs | | | | |
| LSTb | 0.45 | 0.07 | 0.13 | 0.12 |
| LSTc | 0.08 | 0.01 | 0.05 | 0.84 |
| DSLNT | 0.37 | 0.03 | 0.48 | 0.39 |
| DSLNH | 0.38 | 0.04 | 0.19 | 0.37 |
| Fucosylated, Sialylated HMOs | | | | |
| FDSLNH | 0.48 | 0.31 | 0.57 | 0.38 |

Note: NMF scores represent the probability of contribution to (and importance of) a specified HMO variable to the basis component. HMO: human milk oligosaccharide. 2'FL: 2'-fucosyllactose. 3FL: 3-fucosyllactose. LNnT: lacto-N-neotetraose. 3'SL: 3'-sialyllactose. DFLac: difucosyllactose. 6'SL: 6'-sialyllactose. LNT: lacto-N-tetrose. LNFP: lacto-N-fucopentaose. LSTb: sialyl-lacto-N-tetraose b. LSTc: sialyl-lacto-N-tetraose c. DFLNT: difucosyllacto-N-tetrose. LNH: lacto-N-hexaose. DSLNT: disialyllacto-Ntetraose. FLNH: fucosyllacto-N-hexaose. DFLNH: difucosyllacto-N-hexaose. FDSLNH: fucodisialyllacto-N-hexaose. DSLNH: disialyllacto-N-hexaose.

Table 6. NMF scores according to maternal age quartiles for individual HMOs.

| HMOs | Maternal Age in Years ¹ | | | |
|---|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 18.0–22.5 (n = 26) | 22.7–26.6 (n = 27) | 26.9–31.4 (n = 21) | 31.5–40.0 (n = 27) |
| Fucosylated or Sialylated Lactose | | | | |
| 2'FL | 0.54 | 0.60 | 0.99 | 0.44 |
| 3FL | 0.16 | 0.01 | 0.06 | 0.20 |
| DFLac | 0.10 | 0.01 | 0.01 | 0.21 |
| 3'SL | 0.12 | 0.21 | 0.01 | 0.17 |
| 6'SL | 0.18 | 0.46 | 0.20 | 0.14 |
| Non-Fucosylated, Non-Sialylated HMOs | | | | |
| LNT | 0.03 | 0.63 | 0.54 | 0.54 |
| LNnT | 0.65 | 0.79 | 0.92 | 0.64 |
| LNH | 0.22 | 0.09 | 0.39 | 0.03 |
| Fucosylated, Non-Sialylated HMOs | | | | |
| LNFP I | 0.04 | 0.28 | 0.27 | 0.03 |
| LNFP II | 0.54 | 0.14 | 0.09 | 0.37 |
| LNFP III | 0.46 | 0.24 | 0.40 | 0.40 |
| DFLNT | 0.55 | 0.12 | 0.31 | 0.28 |
| FLNH | 0.47 | 0.30 | 0.43 | 0.08 |
| DFLNH | 0.37 | 0.02 | 0.29 | 0.44 |
| Non-Fucosylated, Sialylated HMOs | | | | |
| LSTb | 0.02 | 0.06 | 0.40 | 0.05 |
| LSTc | 0.52 | 0.74 | 0.83 | 0.53 |
| DSLNT | 0.10 | 0.20 | 0.45 | 0.19 |
| DSLNH | 0.55 | 0.47 | 0.29 | 0.19 |
| Fucosylated, Sialylated HMOs | | | | |
| FDSLNH | 0.24 | 0.12 | 0.25 | 0.21 |

NMF scores represent the probability of contribution to (and importance of) a specified HMO variable to the basis component. ¹Baseline information. HMO: human milk oligosaccharide. 2'FL: 2'-fucosyllactose. 3FL: 3-fucosyllactose. LNnT: lacto-N-neotetraose. 3'SL: 3'-sialyllactose. DFLac: difucosyllactose. 6'SL: 6'-sialyllactose. LNT: lacto-N-tetrose. LNFP: lacto-N-fucopentaose. LSTb: sialyl-lacto-N-tetraose b. LSTc: sialyl-lacto-N-tetraose c. DFLNT: difucosyllacto-N-tetrose. LNH: lacto-N-hexaose. DSLNT: disialyllacto-N-tetraose. FLNH: fucosyllacto-N-hexaose. DFLNH: difucosyllacto-N-hexaose. FDSLNH: fucodisialyllacto-N-hexaose. DSLNH: disialyllacto-N-hexaose.

Table 7. NMF scores according to pre-pregnancy BMI for individual HMOs.

| HMOs | Pre-Pregnancy BMI in kg/m ² | | | |
|---|--|--------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| | Underweight (<18.5; n = 3) | Normal Weight (18.5–24.9; n = 48) | Overweight (25.0–29.9; n = 29) | Obesity (>29.9; n = 15) |
| Fucosylated or Sialylated Lactose | | | | |
| 2'FL | 0.16 | 0.61 | 0.99 | 1.00 |
| 3FL | 0.10 | 0.05 | 0.16 | 0.04 |
| DFLac | 0.10 | 0.00 | 0.01 | 0.22 |
| 3'SL | 0.57 | 0.02 | 0.01 | 0.01 |
| 6'SL | 0.03 | 0.35 | 0.16 | 0.57 |
| Non-Fucosylated, Non-Sialylated HMOs | | | | |
| LNT | 0.10 | 0.32 | 0.62 | 0.11 |
| LNnT | 0.10 | 0.80 | 0.84 | 0.90 |
| LNH | 0.04 | 0.31 | 0.19 | 0.23 |
| Fucosylated, Non-Sialylated HMOs | | | | |
| LNFP I | 0.11 | 0.38 | 0.56 | 0.32 |
| LNFP II | 0.18 | 0.11 | 0.12 | 0.06 |
| LNFP III | 0.30 | 0.71 | 0.55 | 0.47 |
| DFLNT | 0.15 | 0.48 | 0.23 | 0.22 |
| FLNH | 0.31 | 0.28 | 0.35 | 0.49 |
| DFLNH | 0.28 | 0.22 | 0.10 | 0.31 |
| Non-Fucosylated, Sialylated HMOs | | | | |
| LSTb | 0.07 | 0.06 | 0.33 | 0.08 |
| LSTc | 0.18 | 0.86 | 0.85 | 0.76 |
| DSLNT | 0.21 | 0.58 | 0.21 | 0.16 |
| DSLNH | 0.03 | 0.37 | 0.38 | 0.39 |
| Fucosylated, Sialylated HMOs | | | | |
| FDSLNH | 0.06 | 0.30 | 0.21 | 0.31 |

NMF scores represent the probability of contribution to (and importance of) a specified HMO variable to the basis component. HMO: human milk oligosaccharide. 2'FL: 2'-fucosyllactose. 3FL: 3-fucosyllactose. LNnT: lacto-N-neotetraose. 3'SL: 3'-sialyllactose. DFLac: difucosyllactose. 6'SL: 6'-sialyllactose. LNT: lacto-N-tetrose. LNFP: lacto-N-fucopentaose. LSTb: sialyl-lacto-N-tetraose b. LSTc: sialyl-lacto-N-tetraose c. DFLNT: difucosyllacto-N-tetrose. LNH: lacto-N-hexaose. DSLNT: disialyllacto-N-tetraose. FLNH: fucosyllacto-N-hexaose. DFLNH: difucosyllacto-N-hexaose. FDSLNH: fucodisialyllacto-N-hexaose. DSLNH: disialyllacto-N-hexaose.

Table 8. NMF scores according to parity for individual HMOs.

| HMOs | Parity in Number of Children ¹ | | | |
|---|---|------------|------------|------------|
| | 0 (n = 53) | 1 (n = 31) | 2 (n = 13) | ≥3 (n = 3) |
| Fucosylated or Sialylated Lactose | | | | |
| 2'FL | 0.98 | 0.99 | 0.60 | 0.27 |
| 3FL | 0.02 | 0.01 | 0.11 | 0.44 |
| DFLac | 0.03 | 0.05 | 0.13 | 0.45 |
| 3'SL | 0.06 | 0.01 | 0.02 | 0.41 |
| 6'SL | 0.30 | 0.34 | 0.37 | 0.08 |
| Non-Fucosylated, Non-Sialylated HMOs | | | | |
| LNT | 0.10 | 0.54 | 0.14 | 0.06 |
| LNnT | 0.90 | 0.96 | 0.82 | 0.50 |
| LNH | 0.26 | 0.36 | 0.17 | 0.38 |
| Fucosylated, Non-Sialylated HMOs | | | | |
| LNFP I | 0.47 | 0.40 | 0.34 | 0.16 |
| LNFP II | 0.10 | 0.04 | 0.21 | 0.01 |
| LNFP III | 0.80 | 0.17 | 0.79 | 0.10 |
| DFLNT | 0.48 | 0.19 | 0.21 | 0.03 |
| FLNH | 0.46 | 0.39 | 0.19 | 0.39 |
| DFLNH | 0.35 | 0.14 | 0.18 | 0.19 |
| Non-Fucosylated, Sialylated HMOs | | | | |
| LSTb | 0.03 | 0.13 | 0.11 | 0.45 |
| LSTc | 0.83 | 0.88 | 0.73 | 0.46 |
| DSLNT | 0.34 | 0.20 | 0.46 | 0.29 |
| DSLNH | 0.37 | 0.44 | 0.33 | 0.48 |
| Fucosylated, Sialylated HMOs | | | | |
| FDSLNH | 0.40 | 0.04 | 0.35 | 0.23 |

NMF scores represent the probability of contribution to (and importance of) a specified HMO variable to the basis component. ¹Baseline information. HMO: human milk oligosaccharide. 2'FL: 2'-fucosyllactose. 3FL: 3-fucosyllactose. LNnT: lacto-N-neotetraose. 3'SL: 3'-sialyllactose. DFLac: difucosyllactose. 6'SL: 6'-sialyllactose. LNT: lacto-N-tetrose. LNFP: lacto-N-fucopentaose. LSTb: sialyl-lacto-N-tetraose b. LSTc: sialyl-lacto-N-tetraose c. DFLNT: difucosyllacto-N-tetrose. LNH: lacto-N-hexaose. DSLNT: disialyllacto-N-tetraose. FLNH: fucosyllacto-N-hexaose. DFLNH: difucosyllacto-N-hexaose. FDSLNH: fucodisialyllacto-N-hexaose. DSLNH: disialyllacto-N-hexaose.

4. Discussion

The present study has several interesting findings. First, differences of HMO concentrations over time were observed. Similar to previous studies [21,29], HMO concentrations in g/L decrease over time postpartum. However, when measured in molar concentrations, HMOs increase over time. This is due to a relative increase in low-molecular HMOs and a relative decrease in high-molecular HMOs over time. The data indicate that looking at weight concentrations in g/L alone provides only a limited picture of HMO composition changes over time. Second, we found that 89.1% of the women were secretors and

that 2'FL was the predominant HMO in their milk at all three collection periods. However, for non-secretor women, LNT (at 2–8 days) and LNFP II (at 28–50 days and 88–119 days) were the most abundant HMOs. Third, differences between secretor and non-secretor women were found for 2'FL, 3FL, 3'SL, DFLac, DFLNH, DFLNT, FDSLNH, LNFP I, LNFP II, LNT, LSTb and LSTc—once again highlighting that single nucleotide polymorphisms in a single fucosyltransferase gene affect the synthesis of almost all HMOs, not only those directly fucosylated by the impaired enzyme.

The proportion of 89.1% of secretor women aligns with another recent study conducted in Brazil that identified 87% of women to be secretors [45]. There are significantly more secretors in Latin American countries, such as Brazil and Peru (98%) [22]. In contrast, countries such as Canada (73%), rural Ethiopia (65%), rural Gambia (65%) and Ghana (68%) presented a smaller prevalence of secretor women [22,23].

McGuire et al. [22] studied the same 19 HMOs using our same analytical platform and found total concentrations of 10.1 g/L for Peruvian women at 15–150 days postpartum compared to 12.5 g/L for 2–8 days, 11.5 g/L for 28–50 days, and 11.3 g/L for 88–119 days in the present study. The only other Brazilian study detected 5.57 g/L of HMO at 17–76 days postpartum [45], which is quite different to the present results. Different analytical platforms (quantitative HPLC-FL vs. semi-quantitative LC-MS) and identification and quantification of different HMOs may contribute to the observed differences in HMO data between the two Brazilian cohorts. Results from a systematic review concluded that there is not a standard method to quantify HMOs yet, but also highlighted that mass spectrometry does not provide absolute quantitative measures, which is why we opted to use HPLC-FL with non-HMO internal standard combined with established HMO standard response curves to allow for absolute quantification [46].

We observed that concentrations of DSLNT, LSTc and LNFP I in secretor women decreased over time, which aligns with previously described data in longitudinal studies [47] and in cross-sectional studies with milk samples at different stages of breastfeeding [20, 24].

The NMF procedure indicated that different HMOs were responsible for the major contribution of the HMO profiles at different post-partum time points. At 2–8 days, LNFP II presented the major contribution, while, at 28–50 and 88–119 days, 2'FL and 3FL were the major contributors, respectively. Our findings partially agree with McGuire et al. [22] results, that found 2'FL as the main contributor of HMO composition at 20–46 and 79–41 days postpartum.

In this study, pre-pregnancy BMI and pre-pregnancy weight were directly correlated with LNnT at 2–8 days. Unlike our study, McGuire et al. [22] observed that maternal weight and BMI were positively correlated with 2'FL and FLNH, and Samuel et al. [21] described that overweight women presented a lower concentration of LNnT, when compared with normal weight women. Our data revealed that pre-pregnancy BMI and pre-pregnancy weight are inversely correlated with LNFP III at 2–8 days. In contrast, McGuire et al. [22] found maternal weight to be positively correlated with LNFP III. While these studies used the same HMO analytical platform, these differences could indicate a variation between the studied populations and by geographic location. Overall, these discrepancies between cohorts warrant further investigations on how maternal pre-pregnancy BMI, pregnancy weight gain, as well as overall maternal nutrition affect HMO composition and how these changes in HMO composition potentially impact infant health and development.

Azad et al. [23] observed higher concentrations of LNT and LNnT and lower concentrations of 3FL in multiparous women. Likewise, Tonon et al. [45] found a positive correlation between parity and LNT and LNnT and a negative correlation with 3FL. In contrast, Samuel et al. [21] observed higher concentrations of LNnT at 17 days postpartum in primiparous women. We observed that mothers with two children had 2'FL as the main component that contributed to the HMO profile. It is possible that interpregnancy interval may play a role on this association, because this interval was previously described as being associated with changes in breastfeeding practices and could also be linked with human milk composition [48]. However, the mechanism that explains the relationship between parity and HMOs is still unclear and new investigations are necessary.

The sensitivity analyses results were mostly in line with the findings observed for the complete dataset and reaffirm the main conclusions of the study. However, it is important to highlight that some minor differences were observed. It is very likely that these minor differences can probably be attributable to the small sample size of the subset analyzed.

There are some limitations that pertain to this study. The first is that the small sample size for non-secretors throughout postpartum limits statistical analysis and the comparison of our results with other studies. Additionally, stratifications according to the Lewis blood group were not possible due to this small sample size. Further, during milk collection the breast was not emptied completely. However, some studies have shown small or no variations of HMOs during the feeding. Thus, samples collected in the middle of feeding can be representative of the whole concentration [49, 50]. Another limitation was the loss of follow-up during all study visits. Despite these limitations, the present study has important strengths. First, the use of a rigorous analytical platform to quantify HMO concentrations instead of merely measuring relative abundances. Second, the use of robust statistical method to identify the HMO profile of Brazilian women, with NMF performed to identify patterns that together explain the data set. Third, the longitudinal design used allowed the assessment of prospective changes of HMO concentrations throughout the postpartum period. Last, to the best of our knowledge, this is the first study that has investigated HMOs concentrations at different time points during lactation in Latin American women.

5. Conclusions

The results found in the present study suggest that HMO composition varied throughout lactation in Brazilian women, with lower concentrations in g/L at 88–119 days, but an increase in concentrations of low-molecular HMOs at the same period. In addition, maternal pre-pregnancy BMI and parity were associated with HMO composition in healthy women in this Brazilian cohort. These study findings represent an important step toward knowing the profile and variation on HMOs composition in Brazilian women and the characteristics associated with this profile, mainly considering the geographic variation of the HMO concentration in different countries of the world. Additionally, this will be important for future studies, to evaluate the impact of HMO in infants' outcomes.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1: Time variation of HMOs concentrations in total and according to secretor status of women followed on Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil ($n = 101$).

Author Contributions: Conceptualization, ALLF, GK and NHAS; methodology, ALLF, RFSA and NCFC; software, ALLF and RFSA; validation, ALLF and NHAS; formal analysis ALLF, RFSA, NCFC, LB, CY, NM and AF; investigation, ALLF, NCFC, MAB, ACCF, NHAS; resources, GK, LB; data curation, ALLF and GK; writing—original draft preparation, ALLF, NCFC, MAB, ACCF, NHAS, GK, and LB; writing—review and editing, ALLF, NCFC, MAB, ACCF, NHAS, RFSA, GK and LB; visualization, ALLF; supervision, GK; project administration, GK; funding acquisition, GK and LB. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding by Rio de Janeiro State Research Support Foundation—FAPERJ by grant #E-26/210.190/2014 (200585) and the National Council for Scientific and Technological Development—CNPq by grant #409676/2016.

Acknowledgments: We thank all cohort participants and their children, as well as the Assis Valente Public Health Center.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Prentice, P.; Ong, K.K.; Schoemaker, M.H.; Van Tol, E.A.F.; Vervoort, J.; Hughes, I.A.; Acerini, C.L.; Dunger, D.B. Breast milk nutrient content and infancy growth. *Acta Paediatr.* **2016**, *105*, 641–647.
2. Bar, S.; Milanaik, R.; Adesman, A. Long-term neurodevelopmental benefits of breastfeeding. *Curr. Opin. Pediatr.* **2016**, *28*, 559–566.
3. Giugliani, E.R.J.; Horta, B.L.; De Mola, C.L.; Lisboa, B.O.; Victora, C.G. Effect of breastfeeding promotion interventions on child growth: A systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr.* **2015**, *104*, 20–29.
4. Erick, M. Breast milk is conditionally perfect. *Med. Hypotheses* **2018**, *111*, 82–89.
5. Victora, C.G.; Bahl, R.; Barros, A.J.D.; França, G.V.A.; Horton, S.; Krusevec, J.; Murch, S.; Sankar, M.J.; Walker, N.; Rollins, N.C. Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet* **2016**, *387*, 475–490.
6. Pérez-Escamilla, R.; Buccini, G.; Segura-Pérez, S.; Piwoz, E. Perspective: Should Exclusive Breastfeeding Still Be Recommended for 6 Months? *Adv. Nutr.* **2019**, *10*, 931–943.
7. WHO. *The Optimal Duration of Exclusive Breastfeeding Report of an Expert Consultation*; WHO: Geneva, Switzerland, 2001.
8. Ballard, O.; Morrow, A.L. Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatr. Clin. North Am.* **2013**, *60*, 49–74.
9. Fields, D.A.; Schneider, C.; Pavela, G. A narrative review of the associations between six bioactive components in breast milk and infant adiposity. *Obesity* **2016**, *24*, 1213–1221.
10. Bode, L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* **2012**, *22*, 1147–1162.
11. Urashima, T.; Hirabayashi, J.; Sato, S.; Kobata, A. Human Milk Oligosaccharides as Essential Tools for Basic and Application Studies on Galectins. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2018**, *30*, SE51–SE65.
12. Bode, L. Human Milk Oligosaccharides: Next-Generation Functions and Questions. *Nestle Nutr Inst Work. Ser* **2019**, *90*, 191–201.
13. Davidson, B.; Meinzen-Derr, J.; Wagner, C.L.; Newburg, D.S.; Morrow, A.L. Fucosylated oligosaccharides in human milk in relation to gestational age and stage of lactation. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **2004**, *554*, 427–430.
14. Coppa, G.V.; Gabrielli, O.; Pierani, P.; Catassi, C.; Carlucci, A.; Giorgi, P.L. Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. *Pediatrics* **1993**, *91*, 637–641.
15. Kumazaki, T.; Yoshida, A. Biochemical evidence that secretor gene, Se, is a structural gene encoding a specific fucosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 4193–4197.
16. Johnson, P.H.; Watkins, W.M. Purification of the Lewis blood-group gene associated alpha-3/4-fucosyltransferase from human milk: An enzyme transferring fucose primarily to type 1 and lactose-based oligosaccharide chains. *Glycoconj. J.* **1992**, *9*, 241–249.
17. Stanley, P.; Cummings, R. Chapter 14: Structures Common to Different Glycans. In *Source Essentials of Glycobiology*, 2nd ed.; Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Stanley, P., Bertozzi, C., Hart, G., Etzler, M., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, NY, USA, 2017.
18. Bode, L.; Jantscher-Krenn, E. Structure-Function Relationships of Human Milk Oligosaccharides. *Adv. Nutr.* **2012**, *3*, 383S–391S.
19. Smilowitz, J.T.; O'Sullivan, A.; Barile, D.; German, J.B.; Lönnnerdal, B.; Slupsky, C.M. The human milk metabolome reveals diverse oligosaccharide profiles. *J. Nutr.* **2013**, *143*, 1709–1718.
20. Austin, S.; De Castro, C.A.; Bénet, T.; Hou, Y.; Sun, H.; Thakkar, S.K.; Pares, G.V.; Zhang, Y.; Wang, P. Temporal Change of the Content of 10 Oligosaccharides in the Milk of Chinese Urban Mothers. *Nutrients*. **2016**, *8*, 346.
21. Samuel, T.M.; Binia, A.; De Castro, C.A.; Thakkar, S.K.; Billeaud, C.; Agosti, M.; Al-Jashi, I.; Costeira, M.J.; Marchini, G.; Martínez-Costa, C.; et al. Impact of maternal characteristics on human milk oligosaccharide composition over the first 4 months of lactation in a cohort of healthy European mothers. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11767–10.
22. McGuire, M.; Meehan, C.L.; McGuire, M.A.; Williams, J.; Foster, J.; Sellen, D.W.; Kamau-Mbuthia, E.W.; Kamundia, E.W.; Mbugua, S.; Moore, S.E.; et al. What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in milk produced by healthy women vary geographically. *Am. J. Clin. Nutr.* **2017**, *105*, 1086–1100.

23. Azad, M.B.; Robertson, B.; Atakora, F.; Becker, A.B.; Subbarao, P.; Moraes, T.; Mandhane, P.J.; Turvey, S.E.; Lefebvre, D.L.; Sears, M.R.; et al. Human Milk Oligosaccharide Concentrations Are Associated with Multiple Fixed and Modifiable Maternal Characteristics, Environmental Factors, and Feeding Practices. *J. Nutr.* **2018**, *148*, 1733–1742.
24. Austin, S.; De Castro, C.A.; Sprenger, N.; Affolter, M.; Affolter, M.; Garcia-Rodenas, C.L.; Beauport, L.; Tolsa, J.-F.; Fumeaux, C.J.F. Human Milk Oligosaccharides in the Milk of Mothers Delivering Term versus Preterm Infants. *Nutrients* **2019**, *11*, 1282.
25. Davis, J.C.C.; Lewis, Z.T.; Krishnan, S.; Bernstein, R.M.; Moore, S.E.; Prentice, A.M.; Mills, D.A.; Lebrilla, C.B.; Zivkovic, A.M. Growth and Morbidity of Gambian Infants are Influenced by Maternal Milk Oligosaccharides and Infant Gut Microbiota. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 40466.
26. Kunz, C.; Rudloff, S.; Baier, W.; Klein, N.; Strobel, S. OLIGOSACCHARIDES IN HUMAN MILK: Structural, Functional, and Metabolic Aspects. *Annu. Rev. Nutr.* **2000**, *20*, 699–722.
27. Bode, L. Recent Advances on Structure, Metabolism, and Function of Human Milk Oligosaccharides. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 2127–2130.
28. Kobata, A. Structures and application of oligosaccharides in human milk. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **2010**, *86*, 731–747.
29. Alderete, T.; Autran, C.; Brekke, B.E.; Knight, R.; Bode, L.; Goran, M.; Fields, D.A. Associations between human milk oligosaccharides and infant body composition in the first 6 mo of life. *Am. J. Clin. Nutr.* **2015**, *102*, 1381–1388.
30. Wang, M.; Li, M.; Wu, S.; Lebrilla, C.B.; Chapkin, R.S.; Ivanov, I.; Donovan, S.M. Fecal Microbiota Composition of Breast-Fed Infants Is Correlated With Human Milk Oligosaccharides Consumed. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2015**, *60*, 825–833.
31. Underwood, M.; Gaerlan, S.; De Leo, M.L.A.; Dimapason, L.; Kalanetra, K.M.; Lemay, D.G.; German, J.B.; Mills, D.A.; Lebrilla, C.B. Human milk oligosaccharides in premature infants: Absorption, excretion, and influence on the intestinal microbiota. *Pediatr. Res.* **2015**, *78*, 670–677.
32. Underwood, M.; Davis, J.C.C.; Kalanetra, K.M.; Gehlot, S.; Patole, S.; Tancredi, D.J.; Mills, D.A.; Lebrilla, C.B.; Simmer, K. Digestion of Human Milk Oligosaccharides by *Bifidobacterium breve* in the Premature Infant. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2017**, *65*, 449–455.
33. Paganini, D.; Uyoga, M.A.; Kortman, G.A.; Boekhorst, J.; Schneeberger, S.; Karanja, S.; Hennet, T.; Zimmermann, M. Maternal Human Milk Oligosaccharide Profile Modulates the Impact of an Intervention with Iron and Galacto-Oligosaccharides in Kenyan Infants. *Nutrients* **2019**, *11*, 2596.
34. Sprenger, N.; Lee, L.Y.; De Castro, C.A.; Steenhout, P.; Thakkar, S.K. Longitudinal change of selected human milk oligosaccharides and association to infants' growth, an observatory, single center, longitudinal cohort study. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0171814.
35. Sumiyoshi, W.; Urashima, T.; Nakamura, T.; Arai, I.; Saito, T.; Tsumura, N.; Wang, B.; Brand-Miller, J.; Watanabe, Y.; Kimura, K. Determination of each neutral oligosaccharide in the milk of Japanese women during the course of lactation. *Br. J. Nutr.* **2003**, *89*, 61–69.
36. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Banco de Leite Humano: Funcionamento, Prevenção e Controle de Riscos*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Anvisa, Brasília: 2007; p. 156.
37. Dave, J.; Wilcox, M.; Kellett, M. Glove powder: Implications for infection control. *J. Hosp. Infect.* **1999**, *42*, 283–285.
38. Jantscher-Krenn, E.; Lauwaet, T.; Bliss, L.A.; Reed, S.L.; Gillin, F.D.; Bode, L. Human milk oligosaccharides reduce *Entamoeba histolytica* attachment and cytotoxicity in vitro. *Br. J. Nutr.* **2012**, *108*, 1839–1846.
39. Ayechu-Muruzabal, V.; Van Stigt, A.H.; Mank, M.; Willemse, L.E.M.; Stahl, B.; Garsen, J.; Land, B.V. Diversity of Human Milk Oligosaccharides and Effects on Early Life Immune Development. *Front. Pediatr.* **2018**, *6*, 239.
40. Triantis, V.; Bode, L.; Van Neerven, J. Immunological Effects of Human Milk Oligosaccharides. *Front. Pediatr.* **2018**, *6*, 190, doi:10.3389/fped.2018.00190.
41. Committee on Obstetric Practice, American Institute of Ultrasound in Medicine, and Society for Maternal-Fetal Medicine. Committee Opinion No 700: Methods for Estimating the Due Date. *Obstet. Gynecol.* **2017**, *129*, e150–e154.
42. World Health Organization. Indicators for assessing infant and young child feeding practices. In Proceedings of the Conclusions of a consensus meeting, Washington, DC, USA, 6–8 November 2007.

43. A Language and Environment for Statistical Computing. In Foundation for Statistical Computing Vienna (Austria), 2015. Available online: <http://www.R-project.org/> (accessed on November 7, 2019).
44. Overholser, B.R.; Sowinski, K.M. Biostatistics Primer: Part 2. *Nutr. Clin. Pr.* **2008**, *23*, 76–84.
45. Tonon, K.; Fisberg, M.; Abrão, A.C.; Miranda, A.; De Moraes, M.B. Maternal and Infant Factors Associated with Human Milk Oligosaccharides Concentrations According to Secretor and Lewis Phenotypes. *Nutrients* **2019**, *11*, 1358.
46. Thurl, S.; Munzert, M.; Boehm, G.; Matthews, C.; Stahl, B. Systematic review of the concentrations of oligosaccharides in human milk. *Nutr. Rev.* **2017**, *75*, 920–933.
47. Thurl, S.; Munzert, M.; Henker, J.; Boehm, G.; Müller-Werner, B.; Jelinek, J.; Stahl, B. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *Br. J. Nutr.* **2010**, *104*, 1261–1271.
48. Conde-Agudelo, A.; Castaño, F.; Norton, M.H.; Rosas-Bermudez, A. Effects of Birth Spacing on Maternal, Perinatal, Infant, and Child Health: A Systematic Review of Causal Mechanisms. *Stud. Fam. Plan.* **2012**, *43*, 93–114.
49. Thurl, S.; Henker, J.; Taut, H.; Tovar, K.; Sawatzki, G. Variations of neutral oligosaccharides and lactose in human milk during the feeding. *Eur. J. Nutr.* **1993**, *32*, 262–269.
50. Viverge, D.; Grimmonprez, L.; Cassanas, G.; Bardet, L.; Solère, M. Diurnal Variations and within the Feed in Lactose and Oligosaccharides of Human Milk. *Ann. Nutr. Metab.* **1986**, *30*, 196–209.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Table 1. Time variation of HMOs concentrations according to Secretor status of women followed on Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil (n=101).

| HMOs (mmol/L) | Secretors women – median (IQR) - Days postpartum (n) | | | Non-Secretors women – median (IQR) - Days postpartum (n) | | |
|---|--|--------------------------------|--------------------------------|--|------------------|-------------------|
| | 2-8 (n=46) | 28-50 (n=68) | 88-119 (n=42) | 2-8 (n=6) | 28-50 (n=7) | 88-119 (n=4) |
| Fucosylated or sialylated lactose | | | | | | |
| 2'FL | 5.42 (4.20-6.64) | 5.18 (3.65-5.96) | 4.38 (3.50-6.26) | 0.01 (0.01-0.01) | 0.03 (0.00-0.05) | 0.03 (0.00-0.06) |
| 3FL | 0.28 ^y (0.19-0.46) | 0.36 ^{xz} (0.28-0.90) | 2.24 ^{yz} (0.36-5.29) | 0.13 (0.06-0.14) | 0.16 (0.13-0.27) | 1.02 (0.64-2.68) |
| DFLac | 0.27 ^y (0.21-0.35) | 0.39 ^{yz} (0.31-0.52) | 0.45 ^{yz} (0.39-0.60) | 0.07 (0.01-0.13) | 0.05 (0.03-0.07) | 0.05 (0.01-0.10) |
| 3'SL | 0.32 ^y (0.25-0.48) | 0.39 ^{yz} (0.29-0.62) | 0.55 ^{yz} (0.44-0.70) | 0.20 (0.11-0.25) | 0.33 (0.25-0.40) | 0.35 (0.17-0.50) |
| 6'SL | 0.39 ^{xy} (0.22-0.55) | 0.64 ^{xz} (0.49-0.93) | 0.51 ^{yz} (0.39-0.74) | 0.25 (0.23-0.55) | 0.55 (0.43-0.89) | 0.41 (0.31-0.59) |
| Non-fucosylated, non-sialylated HMOs | | | | | | |
| LNT | 1.32 (1.02-1.92) | 1.39 (1.03-1.96) | 1.40 (1.09-1.72) | 2.91 (2.47-3.33) | 1.89 (1.53-2.49) | 0.97 (0.81-1.07) |
| LNnT | 0.58 ^x (0.30-1.15) | 0.27 ^{xz} (0.17-0.41) | 0.36 ^{yz} (0.17-0.61) | 0.62 (0.51-1.15) | 0.30 (0.19-0.43) | 0.26 (0.19-0.34) |
| LNH | 0.06 ^y (0.03-0.11) | 0.08 ^z (0.05-0.15) | 0.06 ^{yz} (0.04-0.09) | 0.11 (0.08-0.13) | 0.08 (0.08-0.11) | 0.07 (0.04-0.09) |
| Fucosylated, non-sialylated HMOs | | | | | | |
| LNFP I | 2.85 ^x (2.27-3.49) | 1.72 ^{xz} (1.06-2.42) | 0.82 ^z (0.53-1.63) | 0.10 (0.07-0.11) | 0.12 (0.10-0.13) | 0.13 (0.10-0.14) |
| LNFP II | 0.75 ^y (0.59-1.02) | 1.08 ^z (0.81-1.40) | 1.55 ^{yz} (1.39-2.05) | 2.17 (1.93-2.62) | 2.52 (2.27-2.95) | 3.37 (2.98-3.71) |
| LNFP III | 0.08 ^x (0.07-0.12) | 0.07 ^{xz} (0.05-0.10) | 0.04 ^z (0.02-0.06) | 0.08 (0.07-0.13) | 0.08 (0.05-0.09) | 0.05 (0.03-0.08) |
| DFLNT | 1.54 ^y (1.00-1.85) | 1.55 ^z (0.98-1.87) | 1.27 ^{yz} (1.00-1.63) | 0.30 (0.28-0.44) | 0.39 (0.16-0.68) | 0.92 (0.65-1.11) |
| FLNH | 0.12 ^y (0.06-0.16) | 0.15 ^z (0.08-0.23) | 0.10 ^{yz} (0.07-0.14) | 0.03 (0.02-0.08) | 0.08 (0.04-0.13) | 0.08 (0.07-0.10) |
| DFLNH | 0.14 (0.06-0.22) | 0.17 (0.10-0.26) | 0.13 (0.05-0.21) | 0.02 (0.01-0.03) | 0.02 (0.01-0.03) | 0.02 (0.01-0.09) |
| Non-fucosylated, sialylated HMOs | | | | | | |
| LSTb | 0.08 (0.06-0.11) | 0.10 (0.07-0.13) | 0.07 (0.05-0.11) | 0.18 (0.13-0.18) | 0.16 (0.14-0.19) | 0.11 (0.07-0.18) |
| LSTc | 0.80 ^x (0.64-0.97) | 0.27 ^{xz} (0.19-0.36) | 0.11 ^z (0.07-0.16) | 0.65 (0.43-0.71) | 0.12 (0.10-0.35) | 0.03 (0.02-0.04) |
| DSLNT | 0.58 ^x (0.39-0.73) | 0.30 ^{xz} (0.12-0.41) | 0.18 ^z (0.03-0.30) | 0.69 (0.43-0.86) | 0.12 (0.07-0.39) | 0.10 (0.02-0.27) |
| DSLNH | 0.22 ^{xy} (0.12-0.29) | 0.22 ^{xz} (0.15-0.32) | 0.09 ^z (0.05-0.13) | 0.16 (0.10-0.22) | 0.28 (0.16-0.47) | 0.09 (0.06-0.11) |
| Fucosylated, sialylated HMOs | | | | | | |
| FDSLNH | 0.06 ^y (0.03-0.11) | 0.16 ^z (0.08-0.28) | 0.14 ^{yz} (0.09-0.23) | 0.12 (0.09-0.16) | 0.54 (0.38-0.63) | 0.44 (0.21-0.77) |
| Total | 16.88 (15.98-17.54) | 15.58 (15.06-16.55) | 16.93 (15.44-17.50) | 9.68 (9.61-10.48) | 8.97 (8.51-9.25) | 9.29 (8.78-10.47) |

Notes: IQR: interquartile range. x indicates that the HMO concentration at visit 1 is significantly different ($p < 0.05$) from the concentration at visit 2, y indicates that the HMO concentration at visit 1 is significantly different ($p < 0.05$) from the concentration at visit 3 and z indicates that the HMO concentration at visit 2 is significantly different ($p < 0.05$) from the concentration at visit 3 according to Friedman post-hoc test. DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-N-tetraose; FDSLNH, fucodisialyllacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNnT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetrose; LSTb, sialyl-lacto-N-tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3FL, 3-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose.

7.2 Artigo 2

Associations between human milk oligosaccharides at one month and infant development throughout the first year of infants of a Brazilian cohort.

Authors: Ana Lorena L. Ferreira¹, Nadya H. Alves-Santos¹, Nathalia C. Freitas-Costa¹, Pedro P. T. Santos¹, Mônica Araújo Batalha¹, Amanda C. Cunha Figueiredo¹, Chloe Yonemitsu², Nadia Manivong², Annalee Furst², Lars Bode², Gilberto Kac¹.

Affiliations authors:

1. Nutritional Epidemiology Observatory, Josué de Castro Nutrition Institute, Rio de Janeiro Federal University. Avenida Carlos Chagas Filho 373/CCS, bloco J, 2º andar, sala 29. Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, 21941-902, Brazil.
2. Department of Pediatrics and Mother-Milk-Infant Center of Research Excellence, University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA

Sources of support: This study was supported by Rio de Janeiro State Research Support Foundation - FAPERJ by grant #E-26/210.190/2014 (200585) and the National Council for Scientific and Technological Development - CNPq by grant #409676/2016. This study was funded in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Short running head: Human milk oligosaccharides and infant development.

Data Share Statement: Data described in the manuscript, codebook, and analytic code will be made available upon request pending application and approval.

Abbreviations: HMOs: Human milk oligosaccharides, ASQ-BR: Brazilian Ages & Stages Questionnaires, DAG: Directed Acyclic Graph, SHR: Sub-distribution hazard ratio, REDCap: Research Electronic Data Capture, UCSD: University of California, San Diego, HPLC-FL: High-performance liquid chromatography with fluorescence detection, 2'FL: 2'-fucosyllactose, 3FL: 3-fucosyllactose, 3'SL: 3'-sialyllactose, 6'SL: 6'-sialyllactose, DFLac: difucosyllactose, DFLNH: difucosyllacto-N-hexaose, DFLNT: difucosyllacto-N-tetrose, DSLNH: disialyllacto-N-hexaose, DSLNT: disialyllacto-N-tetraose, FDLSLNH:

fucodisialyllacto-N-hexaose, FLNH: fucosyllacto-N-hexaose, LNFP: lacto-N-fucopentaose, LNH: lacto-N-hexaose, LNnT: lacto-N-neotetraose, LNT: lacto-N-tetrose, LST: sialyl-lacto-N-tetraose, Sia: HMO-bound sialic acid and Fuc: HMO-bound fucose, BMI: Body mass index, GWG: Gestational weight gain, EBF: Exclusive breastfeeding and CI: Confidence interval.

Abstract

Background: Human milk oligosaccharides (HMOs) are unconjugated glycans associated with infant health and development. **Objective:** To investigate the associations between HMOs concentrations and diversity at one month and longitudinal infant development throughout the first year of life. **Methods:** A prospective Brazilian cohort with a baseline (pregnancy) and one (n = 73), six (n = 52), and twelve months follow-ups (n = 44). A total of 19 HMOs were quantified by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. HMO Shannon and Simpson α-diversity indexes were calculated. Infant development was evaluated by Ages & Stages Questionnaires (ASQ-BR). Directed Acyclic Graph was used to define the minimally sufficient adjustment. Cox regressions models with hazard ratios were performed to estimate HMOs associations with a cumulative risk of infants in the monitoring zone for all women and a subset of secretor women. Competing risk according to Fine & Gray models are performed. Cumulative incidence function and sub-distribution hazard ratio (SHR) were calculated adjusted for confounders, considering being in the monitoring zone for each infant development domain as competing event. **Results:** The increase of one unit of 3FL (95%CI 0.003-0.830) and LNH (95%CI 0.004-0.530) are associated with 5% reduction in the SHR of being in the monitoring zone for communication. The one-unit increased in FLNH (95%CI 0.01-0.96) and DSLNT (95%CI 0.10-0.65) are associated with 12% and 25% reduction in the SHR of being in the monitoring zone for fine motor skills. Additionally, a one-unit increase of LNT (95%CI 0.02-0.47) and Shannon (95%CI 0.05-0.78) are associated with 10% and 21% reduction in the SHR of being in the monitoring zone for ≥ 2 domains. **Conclusion:** Higher concentrations of LNT and LNH, fucosylated HMOs (3FL and FLNH), sialylated HMOs (DSLNT), and Shannon diversity, reduced the SHR of being in the monitoring zone of infant development throughout the first year.

Keywords: Human milk oligosaccharides, fucosylated, sialylated, child development, communication, fine motor skills, bioactive compound.

28 Introduction

Oligosaccharides, complex carbohydrates, are the third most abundant solid component of human milk after lactose and lipids. The largest proportion is non-digestible and resistant to gastric acid and digestive enzymes. A small portion can be absorbed in the intestine (1), reaches the systemic circulation, and is excreted with the urine (2-4). However, the majority reaches the large intestine intact, where HMOs serve as prebiotics and contribute to shaping the infant gut microbiome (5) and exert other, microbiome-independent effects (6). Altogether, through these

35 different local and systemic, microbiome-dependent and -independent mechanisms, HMOs can
36 positively affect infant health and development (7).

37 Associations between HMOs and infant short- and long-term outcomes have been
38 described in the literature. For example, individual HMOs associate with reduced HIV
39 transmission through breastfeeding (8-11) and infant mortality (12). HMOs are also associated
40 with food sensitization (13), food allergies (14, 15), and infant growth all the way to 5 years of
41 age (16, 17). In preterm infants, individual HMOs like disialyllacto-N-tetraose (DSLNT) are
42 associated with a reduced risk of developing necrotizing enterocolitis (9, 18). Additionally,
43 concentrations of the HMO 2'-fucosyllactose (2'FL) in mothers' milk at one month postpartum
44 is associated with better cognitive development at two years of life (19), which is corroborated
45 in preclinical studies in rodents (20, 21).

46 In general, HMOs are considered crucial agents in brain and cognitive development,
47 specifically the sialic acid crossing the blood-brain barrier reaching the frontal cortex gray matter
48 (22-25). Several experimental studies with animal models have investigated the mechanisms
49 responsible for this association (20, 21, 26-28). Wang et al. found high concentrations of
50 glutamate and glutamine in pigs' brains receiving sialylated HMOs. These metabolites are
51 considered essential markers of neurodevelopment (29). However, observational studies in
52 humans are scarce and have inconclusive results (19, 30). Further studies are needed to
53 investigate whether results from animal models translate to human infants.

54 To the best of our knowledge, no studies have investigated HMOs and infant
55 development with longitudinal designs within the Latin American population, such as Brazilian
56 infants. This study aimed to investigate associations between HMO concentrations and diversity
57 indexes measured at one month postpartum and longitudinal infant development throughout the
58 first year of the infants' life.

59

60 **Methods**

61 **Study design, eligibility criteria, and ethics**

62 This prospective cohort integrated a broader study conducted at a public health care
63 center in Rio de Janeiro, Brazil. The study design comprised a baseline visit (between 28 and 35
64 gestational weeks – 3rd gestational trimester) and five follow-ups: 2-8 days (visit 1), 28-50 days
65 (one month/visit 2), 88-119 days (three months/visit 3), 180-223 days (six months/visit 4) and
66 365-404 days postpartum (twelve months/visit 5). Data from the baseline, one, six, and twelve
67 months were used for the current analysis.

68 The recruitment lasted from January 2017 to April 2019. It included pregnant women
69 who lived in the programmatic area of the health care center, without twin pregnancy, between
70 18 to 40 years, between 28th to 35th gestational weeks, who intended to remain living within the
71 catchment area after delivery and were free of infectious and chronic diseases (except obesity).
72 A total of 322 pregnant women were invited to participate, and 147 agreed to participate in the
73 study and began the follow-up. At one month, 49 participants discontinued the follow-up, and
74 24 did not collect milk samples. A total of 74 mothers collected milk samples, and 73 infants had
75 complete infant development data. Due to follow-up losses, at six and twelve months, the study
76 retention rate was 69.0% (51/74) and 60.8% (45/74), respectively (**Figure 1**). Participants that
77 delivered a preterm infant (<37 gestational weeks) developed gestational diabetes, pre-
78 eclampsia, or delivered a stillborn were excluded (n = 4).

79 The Research Electronic Data Capture (REDCap - <http://project-redcap.org>) was used to
80 collect data and create a dataset. REDCap is an online platform with a robust data entry tool that
81 allows the management of studies.

82 This study was carried out following the rules of the Declaration of Helsinki of 1975. It
83 was approved by the research ethics committees from the Municipal Secretariat of Health and
84 Civil Defense of the State of Rio de Janeiro (Protocol number: 49218115.0.3001.5279) and the
85 Maternity School of Rio de Janeiro Federal University (Protocol number:
86 49218115.0.0000.5275). After the presentation and clarification about the project, all
87 participants signed a term of consent freely and spontaneously.

88

89 **Human milk data and oligosaccharides analysis**

90 Human milk samples were manually collected at one month and followed the Brazilian
91 Network of Human Milk Banks protocol (31). The trained interviewers instructed the
92 participants to sanitize the hands, cover their hair, and use the face mask. After receiving general
93 instructions, the participants performed milk extractions, including massage techniques and hand
94 expression of breast milk. If necessary, investigators were available to assist participants, and
95 nitrile gloves without talc were used to reduce the possibility of sample contamination (32).

96 Milk was collected preferentially in the morning and after breakfast. All tubes used to
97 collect and process the milk samples were sterile, ribonuclease-free, deoxyribonuclease-free, and
98 non-pyrogenic. A total of 17 mL of milk was collected, processed, and subdivided into one
99 aliquot of 5 mL and 12 aliquots of 1 mL. These aliquots were immediately refrigerated at -20°C.
100 After this process, the samples were transported in a temperature-controlled box (-1°C to -5°C)
101 and stored in a freezer at -80°C at the Federal University of Rio de Janeiro (Nutritional

102 Epidemiology Observatory), where they were kept until analysis. The milk samples were
103 transported to the University of California, San Diego (UCSD) in a thermal box with dry ice and
104 temperature control (-80 °C).

105 HMO analyses were performed at the Bode laboratory at UCSD and had been previously
106 described (33). Briefly, lipids and proteins were removed by solid-phase extraction, the raffinose
107 (non-HMO carbohydrate) was added to allow for absolute quantification. The glycans were
108 labeled with 2-aminobenzamide (2AB) and analyzed by HPLC-FL on an amide-80 column (15
109 cm length, 2 mm inner diameter, 3 µm particle size; Tosoh Bioscience) with a 50 mmol/L
110 ammonium formate–acetonitrile buffer system. Absolute quantification of 19 HMOs based on
111 individual standard response curves concerning the internal raffinose standard was performed.
112 The following HMOs were determined: 2'-fucosyllactose (2'FL), 3-fucosyllactose (3FL), 3'-
113 sialyllactose (3'SL), 6'-sialyllactose (6'SL), difucosyllactose (DFLac), difucosyllacto-N-hexaose
114 (DFLNH), difucosyllacto-N-tetrose (DFLNT), disialyllacto-N-hexaose (DSLNH), disialyllacto-
115 N-tetraose (DSLNT), fucodisialyllacto-N-hexaose (FDSLNH), fucosyllacto-N-hexaose
116 (FLNH), lacto-N-fucopentaose (LNFP) I, LNFP II, LNFP III, lacto-N-hexaose (LNH), lacto-N-
117 neotetraose (LNnT), lacto-N-tetrose (LNT), sialyl-lacto-N-tetraose b (LSTb), and sialyl-lacto-
118 N-tetraose c (LSTc). HMO-bound sialic acids (Sia) and HMO-bound Fucose (Fuc) in nmol/L
119 were calculated as the sum of all sialic acid and fucose moieties bound to each HMO.

120

121 **Infant development**

122 The infant development at one, six, and twelve months were evaluated used the Brazilian
123 version of the Age & Stages Questionnaire (ASQ-BR). This screening scale was translated and
124 adapted to Brazilian infants and had good psychometric characteristics (34-36). The
125 questionnaire comprises six questions for each of the following five domains: communication,
126 gross motor skills, fine motor skills, problem-solving, and personal-social. The mothers acted as
127 respondents, and each question received the following assessment: ‘yes’ (10 points),
128 ‘sometimes’ (5 points), or ‘not yet’ (0 points). The infant scores results can vary between 0 and
129 60 points per domain. There are no specific cutoffs for the ASQ-BR. For the present study, the
130 American cutoffs were used for all infant development domains. These standards were
131 determined based on a study with 18,572 children, aged between one and 66 months, from all
132 over the United States. The adequate development was defined when the score was <1 standard
133 deviation below the normative means of each domain, while the monitoring zone was defined
134 when the infant's scores were ≥ 1 and < 2 standard deviations below the normative means (37).
135 An additional category was created when the infant was in the monitoring zone for ≥ 2 domains.

136 According to the literature, when the infant has inadequate development for ≥ 2 domains, this is
137 a significant risk and a global development delay (38-40). In this study, no infants were classified
138 with inadequate development; however, being in the monitoring zone was regarded as a
139 precursor of a possible delay.

140

141 **Co-variables**

142 The pre-pregnancy weight was self-reported. Maternal height was measured with a
143 stadiometer at visit 2 (Altura Exata, Minas Gerais, Brazil). Pre-pregnancy body mass index
144 (BMI) was calculated using weight (self-reported pre-pregnancy) and height measured at
145 baseline (weight kg/height (m²)). The pre-pregnancy BMI was categorized according to World
146 Health Organization (WHO) classification: underweight (<18.5 kg/m²), normal weight (18.5-
147 24.9 kg/m²), overweight (25.0-29.9 kg/m²), and obesity (≥ 30.0 kg/m²) (41). Gestational weight
148 gain (GWG) was calculated as the difference between the last weight measured in pregnancy,
149 collected from the pregnancy passbook, and the self-reported pre-pregnancy weight considering
150 the gestational age that the weight was measured (42).

151 The first ultrasound was used to calculate gestational age at birth, provided that it was
152 performed between 20 and 24 gestational weeks (≤ 24 weeks, n=72) as recommended by the
153 Committee on Obstetric Practice. Alternatively, the last menstrual period's date was used when
154 ultrasound was unavailable (n=2) (43).

155 Infant weight was measured using a digital scale Seca model 336 (Seca, Hamburg,
156 Germany) and was performed with the infant without clothes and accessories. Infant length was
157 measured using an infantometer Seca model 417 (Seca, Hamburg, Germany), and the head
158 circumference was measured with disposable measuring tape Seca model 211 (Seca, Hamburg,
159 Germany). Length and head circumference were measured in duplicate. The arithmetic mean
160 was used as the estimate (assuming a maximum difference of 0.5 cm for length and 0.2 cm for
161 head circumference between measurements). According to the International Fetal and Newborn
162 Growth Consortium for the 21st Century Study (Intergrowth-21st) Anthropometric Manual
163 recommendations (44), all anthropometric measurements were standardized. The birth z-scores
164 for weight and length were calculated considering the gestational age at birth classification
165 according to the Intergrowth-21st. In all follow-up points, the indices' weight for age, length for
166 age, head circumference for age, and BMI for age were calculated according to WHO standard
167 (45).

168 Alcohol intake during pregnancy and sociodemographic data such as maternal age,
169 education, and parity were self-reported and obtained using structured questionnaires. The birth

170 weight, birth length, and Apgar at the first and fifth minutes were collected from the infant's
171 passbook. The breastfeeding status was classified according to WHO definitions as follows:
172 exclusive breastfeeding (EBF) when the infant received only human milk, without water, tea, or
173 juices, except some medicine and non-EBF when, in addition to human milk, the infant received
174 water, juice, tea or infant formula (46).

175

176 Statistical analysis

177 The statistical analyses were performed using the software R, version 4.0.1. Histograms,
178 skewness, kurtosis measures, and the Shapiro Wilk test were used to evaluate the variables'
179 distribution. HMO concentrations were log-transformed. The Shannon and Simpson indexes
180 were used to calculate the α -diversity of HMOs (Phyloseq Package) (47). An alpha of 0.05 was
181 adopted for all analyses. Mann Whitney tests performed comparisons between participants with
182 and without milk samples to search for biases and comparisons with some follow-up missing
183 data with those attending all visits (complete follow-up).

184 Comparisons of median HMOs concentrations according to infant development status for
185 all domains and the category for ≥ 2 domains (in the monitoring zone/adequate), at each time
186 point, were performed with the Mann Whitney test and presented as box-plot graphs.
187 Confounders were investigated based on a Directed Acyclic Graph (DAG) (Ggdag Package)
188 using the DAGitty program (48). The DAG is based on causal relations between the exposure,
189 outcome, and a set of covariates (previously described), selected from a priori knowledge to
190 identify a minimum, but enough set of covariates, that can confound the statistical analysis. The
191 minimally sufficient adjustment comprised the following variables: gestational age at birth
192 (weeks), gestational weight gain (adequate/inadequate), pre-pregnancy BMI (kg/m^2), maternal
193 age (years), and parity (primiparous/multiparous) (**Figure 2**).

194 Kaplan-Meier curves were performed to investigate infants' probabilities to be in the
195 monitoring zone during follow-up (Survival and Survminer packages). Univariate and
196 multivariate Cox proportional hazards ratios were performed. Conditional models considering
197 ordinate and recurrent events were used to estimate the association between one-month
198 concentrations and alpha diversity indexes of HMOs and the risk of infants being in monitoring
199 zone for communication, gross motor skills, fine motor skills, problem-solving, personal-social,
200 and ≥ 2 domains throughout the first year of life (49).

201 The diagnostics of Cox models were performed to evaluate the proportional hazards
202 assumption using Schoenfeld and Martingale residuals to identify influential observations. A
203 subgroup analysis was performed only with secretor women and their infants because non-

204 secretor women present extreme values of some fucosylated HMOs. Heatmaps with adjusted
205 hazard ratios were plotted to illustrate de cox models.

206 In the current analyses, many models were initially performed to study the association
207 between 19 different types and Shannon and Simpson diversity of HMO and five domains of
208 longitudinal infant development at three-time points. It is well known that this large number of
209 models can increase the probability of type I error (50). Traditionally, methods such as
210 Bonferroni have been used to account for this matter. However, this approach is considered
211 conservative and an inadequate option for multiple corrections because it assumes the tests are
212 independent (50, 51). Instead, we performed the Fine & Gray competing risk models with
213 statistically significant results from the secretors' women set of multivariate Cox models. These
214 models were performed to calculate the cumulative incidence function to estimate the sub-
215 distribution hazard ratio (SHRs) and allow for covariables adjustment (52). The SHRs estimate
216 events in subjects free of this particular event and those previously affected by competing events.
217 This feature is a more robust and adequate estimator because it reduces the probability of random
218 errors and bias inferences (53). To be in the monitoring zone for each domain of infant
219 development were considered as competing events. Thus, non-events included censorship and
220 those affected in other domains (54).

221

222

223 Results

224 At baseline, study participants had a median age of 25.8 years and 12 years of education.
225 54.8% (n=40) of the pregnant women had normal body weight, and 55.4% (n=41) had
226 primiparous births. The median of GWG was 12.0 kg, and the median gestational age at birth
227 was 39.7 weeks. No differences were found between women with and without milk samples for
228 baseline characteristics. No differences were found when women who completed all visits were
229 compared with those classified as follow-up losses (**Table 1**).

230 Infants' median weight and length at birth were 3,250g and 50.0 cm, respectively. The
231 infant weight median at one, six, and twelve months was 4,425 g, 7,870 g, and 9,665 g with
232 0.074, 0.203, and 0.173 weight for age z-score. For infant length, the medians were 54.1 cm,
233 67.3 cm, 75.5 cm, following length for age indexes -0.170, -0.058, and -0.142 at the three visits.
234 Infant BMI median was 15.0 kg/m² at one month, 17.5 kg/m² at six months, and 17.0 kg/m² at
235 twelve months, with respective 0.219, 0.257, and 0.350 z-score of BMI for age (**Table 2**). At one
236 month postpartum, 67.0% (n=49) of infants were exclusively breastfed.

237 Cumulative probability of infants with adequate development at the end of the follow up
 238 was 0.75 (95%CI 0.67 – 0.84) for communication, 0.79 (95% CI 0.71 – 0.89) for gross motor
 239 skills, 0.60 (95%CI 0.44 – 0.83) for fine motor skills, 0.52 (95% CI 0.41 – 0.67) for problem-
 240 solving, 0.57 (95% CI 0.43 – 0.74) for personal-social and 0.57 (95%CI 0.439 – 0.720) for ≥ 2
 241 domains (**Figure 3**).

242 Mothers of infants in the monitoring zone produced milk with smaller median individual
 243 HMOs concentration and HMO diversity when compared with mothers of infants with adequate
 244 development in different domains and visits, as follows: 3FL and Shannon and Simpson diversity
 245 in communication; FLNH in fine motor skills; LNT in personal-social and LNT in ≥ 2 domains
 246 at one month of development; LNT, LNFP III, and DSLNT in gross motor skills; DSLNT and
 247 HMO-bound Sia in personal-social and in ≥ 2 domains at six months of development.
 248 Differences were also observed at twelve months of development for DSLNT in fine motor skills
 249 and ≥ 2 domains. In contrast, mothers of infants in the monitoring zone produced milk with
 250 higher individuals HMOs concentrations, such as 2'FL in two more domains, LNnT in problem-
 251 solving and LNH in personal-social at one-month; 3'SL in gross motor skills, DFLac and HMO-
 252 bound Fuc in gross motor skills, personal-social and ≥ 2 domains at six months and DFLac and
 253 3'SL in personal-social at twelve months (**Figure 4**).

254 Most statistically significant associations found with multivariate Cox regression models
 255 indicated an inverse association between HMO concentrations and diversity and the probability
 256 of infants to be in the monitoring zone of longitudinal infant development domains. This
 257 occurred for communication (3FL, LNH, DFLNT, Shannon and Simpson), gross motor skills
 258 (LNT, LNFP II, Simpson), fine motor skills (FLNH), problem-solving (LNT), personal-social
 259 (LNT), and ≥ 2 domains (LNT and Simpson) (**Figure 5**). Direct associations were also observed
 260 with increased probabilities of infants to be in the monitoring zone when following concentration
 261 was greater for gross motor skills (DSLNH), for personal-social (3'SL, DFLac, and DFLNT),
 262 and ≥ 2 domains (LSTc and DSLNH) (**Figure 5 and Supplementary Table 1 and**
Supplementary Table 2).

263 A subgroup analysis only with secretor mothers revealed that twelve out of thirteen
 264 inverse associations previously found in multivariate models with all women remained
 265 statistically significant. Additionally, nine other inverse associations were observed for
 266 communication and 6'SL gross motor skills and Shannon, fine motor skills and LNT, FLNH,
 267 DSLNT, HMO-bound Sia and HMO Simpson diversity, and ≥ 2 domains 6'SL, DSLNT, and
 268 HMO Shannon diversity. Of the six direct associations previously found, with all women, three

270 remained in subgroup analyses, and only one other result was observed for gross motor and
 271 LNFPI (**Figure 6 and Supplementary Table 3 and Supplementary Table 4**).

272 After performing competing risk analyses with multivariate Fine & Gray models, it was
 273 observed that an increase of one unit of 3FL (SHR: 0.05, CI95% 0.003-0.83) and LNH (SHR:
 274 0.05, CI95% 0.004-0.53) are associated with a reduction of 0.05 in the SHR of being in the
 275 monitoring zone for communication. It was also observed that an increase in FLNH (SHR: 0.12,
 276 CI95% 0.01-0.96) and DSLNT (SHR: 0.25, CI95% 0.10-0.65) are associated with a reduction
 277 of, respectively, 0.12 and 0.25 in the SHR of being in the monitoring zone for fine motor skills.
 278 Additionally, an increase in LNT (SHR: 0.10, CI95% 0.02-0.47) and HMO Shannon diversity
 279 (SHR: 0.21, CI95% 0.05-0.78) are associated with a reduction of, respectively, 0.10 and 0.21 in
 280 the SHR of being in the monitoring zone for ≥ 2 domains considering the competing risks (**Table**
 281 **3**).

282

283 Discussion

284 The present study was conducted with Brazilian mother-infant pairs and had several
 285 interesting findings. In preliminary multivariate cox models, thirteen inverse associations and
 286 six direct associations were found between different HMOs and infant development domains.
 287 When a subgroup analysis with secretor women was performed, twelve out of these thirteen
 288 inverse associations remained statistically significant, and nine others were observed. Three
 289 direct associations also remained statistically significant, and one new was found. According to
 290 Fine & Gray, the competing risks models, with significant results found in multivariate Cox
 291 models for secretor women subset, showed that one unit increase of 3FL and LNH is associated
 292 with 5% reduction in the SHR of being in the monitoring zone for communication. Additionally,
 293 an increase in FLNH and DSLNT are associated, respectively, with 12% and 25% reduction in
 294 the SHR of being in the monitoring zone for fine motor skills, and an increase in LNT and
 295 Shannon, are associated, respectively, with 10% and 21% reduction in the SHR of being in the
 296 monitoring zone for ≥ 2 domains. Fucosylated and sialylated HMOs and Shannon diversity, with
 297 higher concentrations and diversity, protected the infant from being in the monitoring zone in
 298 their first year of life, even when being in the monitoring zone for each infant development
 299 domain was a competing event.

300 HMOs are considered an important determinant of infant intelligence development (55),
 301 and sialic acid, in particular, had been the most described compound responsible for this
 302 relationship in studies with animal models (20, 21, 26, 28). Among secretor women in competing
 303 risk analyses, we found an increase in DSLNT, a sialylated HMO, which reduced the infant's

304 risk to be in the monitoring zone for fine motor skills. This relation's hypothetical mechanism
305 comprises the strong association between HMO sialic acid and the increased sialic acid
306 concentration in gangliosides in the infant's brain (25). An experimental study with 20 infants
307 (breastfed n=11 and formula-fed n=9) from South Australia, diagnosed with sudden infant death
308 syndrome, revealed that breastfed infants presented higher sialic acid during postmortem
309 examinations acid concentrations in gangliosides of frontal cortex gray matter than formula-fed
310 (56). Elevated sialic acid concentrations in gangliosides promote differentiation and dendritic
311 arborization during neurodevelopment, resulting in better cognitive development (25).

312 A Chinese study with 133 infants was performed at three, 42, and 90 days postpartum to
313 evaluate the effect of sialic acid on physical growth and infant development at each time. Zhu &
314 Li (2017) used a scale of infant development that combines different abilities in global mental
315 and psychomotor development domains. The group with a higher concentration of sialic acid at
316 three and 42 days postpartum presented higher cognitive development index scores, a
317 combination of speech function, memory, and simple problem-solving skills (30). These results
318 contradict the current study findings because only inverse associations with sialylated HMOs
319 (DSLNH) and fine motor skills were observed. The different screening tools used may likely
320 have influenced the conflicting results.

321 In experimental studies, fucosylated HMOs were directly associated with cognitive
322 development (23, 24). The 2'FL oral supplementation in newborn rats during lactation improved
323 cognitive abilities in adult life (20). Another study with 2'FL supplementation (350 mg/kg) for
324 five weeks in adult rats and 12 weeks in adult mice resulted in significantly better learning
325 abilities and higher expression of memory molecules storage, like brain-derived neurotrophic
326 factor (21). In this context, an observational study with 50 pairs of Hispanic mother-infants
327 showed that the 2'FL human milk concentration at one month contributed to the infant's
328 cognitive development at 24 months (19). In the present study, we did not find significant
329 associations with 2'FL but with other fucosylated HMOs, such as 3FL (communication) and
330 FLNH (fine motor skills).

331 Additionally, fucosylated HMOs' effect on infant gut microbiota must be highlighted
332 once the individual HMOs could shape the microbial communities' development. That can
333 positively impact neurodevelopment and motor skills (57, 58). Furthermore, HMOs'
334 microbiome-independent effects in the infant gut, such as the interaction between HMOs and
335 immune cells, play an important role in immunological development and indirectly influence
336 infant development (6).

337 It is worth noting that we also found that higher HMO Shannon diversity was associated
338 with a smaller risk of the infant being in the development monitoring zone (for ≥ 2 domains).
339 Thus, greater HMO diversity generated protection effects on infant health. In contrast, less HMO
340 diversity has been documented to be associated with adverse infant outcomes (17, 59). A
341 Swedish study with 134 preterm infants found a smaller HMO Shannon diversity index among
342 infants who developed necrotizing enterocolitis than those who did not develop the disease (60).
343 A Finnish longitudinal study with 802 pairs showed an inverse association between diversity
344 indexes of secretor mothers and z-score of length (follow-up at 3-12 months and 1-5 years) and
345 weight for age (follow-up at 3-12 months) (17). The current manuscript is the first to associate
346 HMO diversity indexes and longitudinal measures of infant development. The benefits resulting
347 from the greater diversity of HMOs in children's health may indirectly impact infant
348 development through protecting against disease and providing adequate conditions for fully
349 developing intelligence and motor skills.

350 This study presents strengths that must be highlighted. A rigorous analytical platform
351 was used to measuring relative abundances and quantify HMO concentrations. The use of DAGs
352 is another strength as it considers minimal sufficient adjustment avoiding overfitting.
353 Additionally, associations were estimated using the best-fitted model to evade the data dispersion
354 and evaluate the multivariate competing risk models. This was an approach aiming to reduce the
355 bias arising from multiple testing. Finally, to the best of our knowledge, this is the first study to
356 explore the association of 19 HMO concentrations and diversity and longitudinal infant
357 development in the Latin American population.

358 The study also has some limitations. The first one is that the use of ASQ-BR is a screening
359 scale and not a diagnostic tool. The interviewers were trained to minimize these limitations, and
360 the procedures of data collection were standardized, so the assessment had good validity. The
361 use of American cutoffs can be considered a limitation. However, so far, we have no cutoff for
362 the Brazilian population. Additionally, according to maternal secretor status, the lack of stratified
363 analysis may also be a limitation, considering that this status influences HMO composition and
364 diversity. However, the subgroup analysis was performed to minimize this effect. Another
365 limitation was the frequency of 38.4% of losses of follow-up throughout the study.
366 Notwithstanding, the cox model with recurrent measurement considered the available data for
367 each woman at each visit and helped minimize the follow-up losses.

368 In summary, higher concentrations at one month of 3FL, LNH (communication), FLNH,
369 DSLNT (fine motor skills), LNT, and Shannon diversity (≥ 2 domains) in secretor women were
370 found to reduce the risk over the first year of life of infants being in the monitoring zone of

371 development when competing risks are considered. Future longitudinal studies with multiples
372 measurements of HMOs through the postpartum period, larger sample size, and more accurate
373 infant development assessment should be encouraged better to understand the associations
374 between HMOs and infant development.

375

376 **Acknowledgment**

377 We thank all cohort participants and their children and the Assis Valente Public Health
378 Center, where the data was collected. We also thank the Rio de Janeiro State Research Support
379 Foundation – FAPERJ, the National Council for Scientific and Technological Development –
380 CNPq and the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* – Brasil (CAPES)
381 for funding this study.

382 ALLF and GK participated in project conception, development of overall research plan,
383 and study oversight. ALLF, NCFC, MAB, ACCF, and NHAS researched with hands-on conduct
384 of the data collection. LB, CY, NM, and AF provided essential materials and analyzed the
385 HMOs. PPS and ALLF performed the statistical analysis. ALLF, NCFC, MAB, ACCF, NHAS,
386 GK, LB wrote the paper, and ALLF had primary responsibility for the final content. All authors
387 have read and approved the final manuscript. The authors report no conflicts of interest.

References

1. Engfer M, Stahl B, Finke B, Sawatzki G, Daniel H. - Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper. *Am J Clin Nutr* 2000;71(6):1589-96.
2. Ruhaak L, Stroble C, Underwood M, Lebrilla C. - Detection of milk oligosaccharides in plasma of infants. *Anal Bioanal Chem* 2014;406(24):5775-84.
3. Goehring K, Kennedy A, Prieto P, Buck R. Direct evidence for the presence of human milk oligosaccharides in the circulation of breastfed infants. *PLoS One* 2014;9(7):e101692. doi: 10.1371/journal.pone.0101692.
4. Underwood MA, Gaerlan S, De Leoz ML, Dimapasoc L, Kalanetra KM, Lemay DG, German JB, Mills DA, Lebrilla CB. Human milk oligosaccharides in premature infants: absorption, excretion, and influence on the intestinal microbiota. *Pediatr Res* 2015;78(6):670-7. doi: 10.1038/pr.2015.162.
5. Wang M, Li M, Wu S, Lebrilla CB, Chapkin RS, Ivanov I, Donovan SM. Fecal microbiota composition of breast-fed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015;60(6):825-33. doi: 10.1097/MPG.0000000000000752.
6. Walsh C, Lane JA, van Sinderen D, Hickey RM. Human milk oligosaccharides: Shaping the infant gut microbiota and supporting health. *J Funct Foods* 2020;72:104074. doi: 10.1016/j.jff.2020.104074.
7. Wu Y, Shao Z, Gao W, Li H, Xu M. - [Relationship between the level of sialic acid during perinatal period and early. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2014;52(2):107-11.
8. Bode L, Kuhn L, Kim HY, Hsiao L, Nissan C, Sinkala M, Kankasa C, Mwiya M, Thea DM, Aldrovandi GM. Human milk oligosaccharide concentration and risk of postnatal transmission of HIV through breastfeeding. *Am J Clin Nutr* 2012;96(4):831-9. doi: 10.3945/ajcn.112.039503.
9. Van Niekerk E, Autran CA, Nel DG, Kirsten GF, Blaauw R, Bode L. Human milk oligosaccharides differ between HIV-infected and HIV-uninfected mothers and are related to necrotizing enterocolitis incidence in their preterm very-low-birth-weight infants. *J Nutr* 2014;144(8):1227-33. doi: 10.3945/jn.113.187799.
10. Wahl A, Baker C, Spagnuolo RA, Stamper LW, Fouada GG, Permar SR, Hinde K, Kuhn L, Bode L, Aldrovandi GM, et al. Breast Milk of HIV-Positive Mothers Has

- Potent and Species-Specific In Vivo HIV-Inhibitory Activity. *J Virol* 2015;89(21):10868-78. doi: 10.1128/JVI.01702-15.
11. Bender JM, Li F, Martelly S, Byrt E, Rouzier V, Leo M, Tobin N, Pannaraj PS, Adisetiyo H, Rollie A, et al. Maternal HIV infection influences the microbiome of HIV-uninfected infants. *Sci Transl Med* 2016;8(349):349ra100. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf5103.
 12. Kuhn L, Kim H-Y, Hsiao L, Nissan C, Kankasa C, Mwiya M, Thea DM, Aldrovandi GM, Bode L. Oligosaccharide composition of breast milk influences survival of uninfected. *J Nutr* 2015;145(1):66-72.
 13. Miliku K, Robertson B, Sharma AK, Subbarao P, Becker AB, Mandhane PJ, Turvey SE, Lefebvre DL, Sears MR, Bode L, et al. Human milk oligosaccharide profiles and food sensitization among infants in the CHILD Study. *Allergy* 2018;73(10):2070-3. doi: 10.1111/all.13476.
 14. Seppo AE, Autran CA, Bode L, Jarvinen KM. Human milk oligosaccharides and development of cow's milk allergy in infants. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139(2):708-11.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2016.08.031.
 15. Lodge CJ, Lowe AJ, Milanzi E, Bowatte G, Abramson MJ, Tsimiklis H, Axelrad C, Robertson B, Darling AE, Svanes C, et al. Human milk oligosaccharide profiles and allergic disease up to 18 years. *J Allergy Clin Immunol* 2020. doi: 10.1016/j.jaci.2020.06.027.
 16. Larsson MW, Lind MV, Laursen RP, Yonemitsu C, Larnkjær A, Mølgaard C, Michaelsen KF, Bode L. Human Milk Oligosaccharide Composition Is Associated With Excessive Weight Gain During Exclusive Breastfeeding-An Explorative Study. *Front Pediatr* 2019;7:297. doi: 10.3389/fped.2019.00297.
 17. Lagström H, Rautava S, Ollila H, Kaljonen A, Turta O, Mäkelä J, Yonemitsu C, Gupta J, Bode L. Associations between human milk oligosaccharides and growth in infancy and early childhood. *Am J Clin Nutr* 2020;111(4):769-78. doi: 10.1093/ajcn/nqaa010.
 18. Autran CA, Kellman BP, Kim JH, Asztalos E, Blood AB, Spence ECH, Patel AL, Hou J, Lewis NE, Bode L. Human milk oligosaccharide composition predicts risk of necrotising enterocolitis in preterm infants. *Gut* 2018;67(6):1064-70. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312819.
 19. Berger PK, Plows JF, Jones RB, Alderete TL, Yonemitsu C, Poulsen M, Ryoo JH, Peterson BS, Bode L, Goran MI. Human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose links

- feedings at 1 month to cognitive development at 24 months in infants of normal and overweight mothers. PLoS One 2020;15(2):e0228323. doi: 10.1371/journal.pone.0228323.
20. Oliveros E, Ramirez M, Vazquez E, Barranco A, Gruart A, Delgado-Garcia JM, Buck R, Rueda R, Martin MJ. Oral supplementation of 2'-fucosyllactose during lactation improves memory and learning in rats. J Nutr Biochem 2016;31:20-7. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.12.014.
 21. Vazquez E, Barranco A, Ramirez M, Gruart A, Delgado-Garcia JM, Martinez-Lara E, Blanco S, Martin MJ, Castany E, Buck R, et al. Effects of a human milk oligosaccharide, 2'-fucosyllactose, on hippocampal long-term potentiation and learning capabilities in rodents. J Nutr Biochem 2015;26(5):455-65. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.11.016.
 22. Kunz C, Rodriguez-Palmero M, Koletzko B, Jensen R. Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins, and carbohydrates. Clin Perinatol 1999;26(2):307-33.
 23. Schanler RJ, Hurst NM, Lau C. The use of human milk and breastfeeding in premature infants. Clin Perinatol 1999;26(2):379-98, vii.
 24. Newburg DS. Innate immunity and human milk. J Nutr 2005;135(5):1308-12.
 25. Wang B. - Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. Annu Rev Nutr 2009;29:177-222.
 26. Cerdó T, Diéguez E, Campoy C. Infant growth, neurodevelopment and gut microbiota during infancy: which nutrients are crucial? Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2019;22(6):434-41. doi: 10.1097/MCO.0000000000000606.
 27. Charbonneau MR, O'Donnell D, Blanton LV, Totten SM, Davis JC, Barratt MJ, Cheng J, Guruge J, Talcott M, Bain JR, et al. Sialylated Milk Oligosaccharides Promote Microbiota-Dependent Growth in Models of Infant Undernutrition. Cell 2016;164(5):859-71. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.024.
 28. Wang B, Yu B, Karim M, Hu H, Sun Y, McGreevy P, Petocz P, Held S, Brand-Miller J. Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets. Am J Clin Nutr 2007;85(2):561-9.
 29. Wang HX, Chen Y, Haque Z, de Veer M, Egan G, Wang B. Sialylated milk oligosaccharides alter neurotransmitters and brain metabolites in piglets: an. Nutr Neurosci 2019;1-11. doi: 10.1080/1028415X.2019.1691856.

30. Zhu Y, Li M. Effects of sialic acid in serum and breast milk on the growth and development of infants at different stages during pregnancy and lactation. *Int J Clin Exp Med* 2017;10:12322-8.
31. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa 2007:156.
32. Dave J, Wilcox MH, Kellett M. Glove powder: implications for infection control. *J Hosp Infect* 1999;42(4):283-5. doi: 10.1053/jhin.1998.0592.
33. Jantscher-Krenn E, Zhrebtssov M, Nissan C, Goth K, Guner YS, Naidu N, Choudhury B, Grishin AV, Ford HR, Bode L. The human milk oligosaccharide disialyllacto-N-tetraose prevents necrotising enterocolitis in neonatal rats. *Gut* 2012;61(10):1417-25. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301404.
34. Eickmann SH, Emond AM, Lima M. Evaluation of child development: beyond the neuromotor aspect. *J Pediatr (Rio J)* 2016;92(3 Suppl 1):S71-83. doi: 10.1016/j.jped.2016.01.007.
35. Silva MAd, Mendonça Filho EJd, Mônego BG, Bandeira DR. Instruments for multidimensional assessment of child development: a systematic review. *Early Child Development and Care* 2018.
36. Filgueiras A, Pires P, Maissonette S, Landeira-Fernandez J. Psychometric properties of the Brazilian-adapted version of the Ages and Stages Questionnaire in public child daycare centers. *Early Hum Dev* 2013;89(8):561-76. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2013.02.005.
37. Squires J, Twombly E, Bricker D, Potter L. Excerpted from ASQ-3™ User's Guide. Brookes Publishing 2009.
38. Dornelas LeF, Duarte NM, Magalhães LeC. [Neuropsychomotor developmental delay: conceptual map, term definitions, uses and limitations]. *Rev Paul Pediatr* 2015;33(1):88-103. doi: 10.1016/j.rpped.2014.04.009.
39. Majnemer A, Shevell MI. Diagnostic yield of the neurologic assessment of the developmentally delayed child. *J Pediatr* 1995;127(2):193-9. doi: 10.1016/s0022-3476(95)70294-6.
40. Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, Majnemer A, Noetzel M, Sheth RD, Neurology QSSotAAo, et al. Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child

- Neurology Society. Neurology 2003;60(3):367-80. doi: 10.1212/01.wnl.0000031431.81555.16.
41. World Health Organization, WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneve: Who library cataloguing-in-publication data, 1995.
 42. Bannon AL, Waring ME, Leung K, Masiero JV, Stone JM, Scannell EC, Moore Simas TA. Comparison of Self-reported and Measured Pre-pregnancy Weight: Implications for Gestational Weight Gain Counseling. Matern Child Health J 2017;21(7):1469-78. doi: 10.1007/s10995-017-2266-3.
 43. Committee on Obstetric Practice tAIoUiM, and the Society for Maternal-Fetal Medicine. Committee Opinion No 700: Methods for Estimating the Due Date. Obstet Gynecol 2017;129(5):e150-e4. doi: 10.1097/AOG.0000000000002046.
 44. INTERGROWTH-21st AG. ANTHROPOMETRY HANDBOOK. The International Fetal and Newborn Growth Consortium., 2012.
 45. World Health Organization, WHO. WHO child growth standards : length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-forheight and body mass index-for-age : methods and developmen. In: Onis Md, ed. Switzerland: WHO Press, 2006.
 46. World Health Organization, WHO. INDICATORS FOR ASSESSING INFANT AND YOUNG CHILD FEEDING PRACTICES. Washington D.C., USA: Conclusions of a consensus meeting held 6-8 November 2007, 2007.
 47. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. PLoS One 2013;8(4):e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217.
 48. Textor J, Hardt J, Knüppel S. DAGitty: a graphical tool for analyzing causal diagrams. Epidemiology 2011;22(5):745. doi: 10.1097/EDE.0b013e318225c2be.
 49. Therneau T, Crowson C, Atkinson E. Using Time Dependent Covariates and Time Dependent Coefficients in the Cox Model. June 12, 2020.
 50. Lee S, Lee DK. What is the proper way to apply the multiple comparison test? Korean J Anesthesiol 2018;71(5):353-60. doi: 10.4097/kja.d.18.00242.
 51. Hashemi R, Commenges D. Correction of the p-value after multiple tests in a Cox proportional hazard model. Lifetime Data Anal 2002;8(4):335-48. doi: 10.1023/a:1020514804325.
 52. Fine JP, Gray R. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk . J Am Stat Assoc 1999;94 496-509.

53. Austin PC, Fine JP. Practical recommendations for reporting Fine-Gray model analyses for competing risk. *Stat Med* 2017;36(27):4391-400.
54. Poythress JC, Lee MY, Young J. Planning and analyzing clinical trials with competing risks: Recommendations for choosing appropriate statistical methodology. *Pharm Stat* 2020;19(1):4-21. doi: 10.1002/pst.1966.
55. Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*. 2012/04/20 ed, 2012:1147-62.
56. Wang B, McVeagh P, Petocz P, Brand-Miller J. Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breastfed compared with formula-fed infants. *Am J Clin Nutr* 2003;78(5):1024-9.
57. Carlson AL, Xia K, Azcarate-Peril MA, Goldman BD, Ahn M, Styner MA, Thompson AL, Geng X, Gilmore JH, Knickmeyer RC. Infant Gut Microbiome Associated With Cognitive Development. *Biol Psychiatry* 2018;83(2):148-59. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.06.021.
58. Sordillo JE, Korrick S, Laranjo N, Carey V, Weinstock GM, Gold DR, O'Connor G, Sandel M, Bacharier LB, Beigelman A, et al. Association of the Infant Gut Microbiome With Early Childhood Neurodevelopmental Outcomes: An Ancillary Study to the VDAART Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open* 2019;2(3):e190905. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.0905.
59. Wejryd E, Marti M, Marchini G, Werme A, Jonsson B, Landberg E, Abrahamsson TR. Low Diversity of Human Milk Oligosaccharides is Associated with Necrotising Enterocolitis in Extremely Low Birth Weight Infants. *Nutrients* 2018;10(10). doi: 10.3390/nu10101556.

Table 1. Demographic and anthropometric profile of women on Brazilian cohort with and without milk samples and throughout the follow-up period. Rio de Janeiro, Brazil.

| Variables | Participants without HMO samples (N = 73) | Participants with HMO samples (N = 74) | P | Participants with some missing follow-up (N = 39) | Participants with complete follow-up (N = 35) | P |
|---|--|---|----------|--|--|----------|
| | Median (IQR) | | | Median (IQR) | | |
| Maternal age* (years) | 27.7 (23.1-31.3) | 25.8 (22.2-31.5) | 0.690 | 27.7 (22.2, 32.6) | 25.7 (22.1, 30.0) | 0.504 |
| Education* (years) | 12.0 (9.0-12.0) | 12.0 (10.0-12.0) | 0.114 | 12.0 (10.5, 12.0) | 12.0 (9.5, 12.0) | 0.530 |
| Pregnancy dietary intake* (kcal) | 2,814.0 (2,178.4-4,540.4) ¹ | 2,732.3 (1,996.4-3,827.9) ² | 0.544 | 2,670.1 (1,859.1, 4,263.6) | 2,798.0 (2,006.9, 3,710.4) | 0.907 |
| Pre-pregnancy weight* (kg) | 62.0 (55.5-72.0) ³ | 62.5 (55.2-71.0) | 0.989 | 62.0 (56.5, 71.5) | 63.0 (55.0, 72.0) | 0.931 |
| Gestational weight gain (kg) | 12.0 (7.5-17.8) ⁴ | 12.5 (9.0-15.6) | 0.806 | 11.3 (8.8, 15.1) | 13.6 (9.2, 16.5) | 0.244 |
| Gestational age at birth (weeks) | 39.4 (38.8, 40.9) | 39.7 (38.9, 40.3) | 0.991 | 39.3 (38.9, 40.4) | 39.6 (38.6, 41.0) | 0.845 |
| Pre-pregnancy BMI (kg/m ²) | 24.7 (21.8-29.8) ⁶ | 24.3 (21.1-28.0) ⁵ | 0.617 | 24.5 (22.0, 27.9) | 24.3 (20.7, 28.7) | 0.728 |
| | | % (N) | P | % (N) | | P |
| Pre-pregnancy BMI status (kg/m ²) | | | | | | |
| Normal weight (<25.0) | 54.1 (20) ⁶ | 54.8 (40) ⁵ | 0.941 | 53.9 (21) | 54.3 (19) | 0.970 |
| Excessive weight (\geq 25.0) | 45.9 (17) ⁶ | 45.2 (33) ⁵ | | 46.1 (18) | 45.7 (16) | |
| Primiparous (yes) | 49.3 (36) | 55.4 (41) | 0.460 | 51.3 (20) | 60.0 (21) | 0.451 |
| Pregnancy physical activity (yes) | 31.3 (21) ⁵ | 32.9 (24) ⁵ | 0.846 | 33.3 (13) | 32.4 (11) | 0.929 |
| Alcohol consumption in pregnancy (yes) | 42.3 (30) ³ | 45.2 (33) ⁵ | 0.721 | 38.2 (15) | 51.0 (17) | 0.077 |

Note: IQR: interquartile range; BMI: body mass index; ID: Infant development. Bold *P* indicate differences observed between participants with and without HMO or participants with and without infant development data at 12 months according to Mann-Whitney (continues values), or Chi-square (categorical variables), considering p-value < 0.05. *Baseline information. Because of missing data: ¹ n=59, ² n=70, ³ n=71, ⁴ n=68, ⁵ n=72, ⁶ n=26, ⁵ n=73, ⁶ n=37, ⁷ n=67.

Table 2. Profile at birth and one, six, and 12 months of children followed in a Brazilian cohort.

| Infants | Birth (N = 74) | One month (N = 73) | Six months (N = 51) | 12 months (N = 45) |
|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Median (IQR) | | | |
| Apgar 1 st minute | 9.0 ¹ (8.0-9.0) | - | - | - |
| Apgar 5 th minute | 9.0 ¹ (9.0-9.0) | - | - | - |
| Sex - % (N) | | - | - | - |
| Male | 51.4 (38) | | | |
| Female | 48.6 (36) | | | |
| Age (days) | - | 33.0 (30.0-36.0) | 191.0 (185.0-197.5) | 376.0 (371.0-382.8) |
| Weight (g) | 3,250 ² (3,030-3,640) | 4,425 (4,017-4,750) | 7,870 (7,465-8,720) | 9,665 (8,945-10,500) |
| Length (cm) | 50.0 ² (49.0-51.0) | 54.1 (52.7-55.5) | 67.3 (65.8-68.9) | 75.5 (74.0-76.5) |
| Head circumference (cm) | - | 37.6 (36.7-38.5) | 43.3 (42.5-44.1) | 46.2 (45.5-47.3) |
| BMI (kg/m ²) | - | 15.0 (14.2-15.7) | 17.5 (16.4-18.6) | 17.0 (16.2-17.7) |
| Z-score weight for age | 0.256 (-1.140-1.670) ³ | 0.074 (-0.588-0.550) | 0.203 (-0.388-0.932) | 0.173 (-0.226-0.826) |
| Z-score length for age | 0.734 (-0.770-2.230) ³ | -0.170 (-0.745-0.668) | -0.058 (-0.578-0.780) | -0.142 (-0.626-0.336) |
| Z-score BMI for age | - | 0.219 (-0.381-0.635) ² | 0.257 (-0.589-1.022) | 0.350 (-0.227-0.930) |
| Z-score head circumference for age | - | 0.449 (-0.193-1.262) | 0.425 (-0.191-0.746) | 0.665 (-0.293-1.007) |

Note: Because of missing data: ¹ N=72, ² N=73. ³Intergrowth z-score.

Table 3. The subdistribution hazard ratio (SHR) of cumulative incidence function (competing risk Fine & Gray models).

| HMO | Infant development domains | SHRs ¹ (95% CI ²) | P |
|---------|----------------------------|--|--------------|
| 3FL | Communication | 0.05 (0.003-0.83) | 0.037 |
| 6'SL | Communication | 2.46 (0.01-871.42)* | 0.706 |
| 6'SL | 2 or > domains | 0.22 (0.04-1.26) | 0.090 |
| LNT | Gross Motor Skills | 0.05 (0.00-6.87) | 0.240 |
| LNT | Fine Motor Skills | 0.08 (0.00-7.01) | 0.270 |
| LNT | Problem-solving | 33.93 (1.16-991.88)* | 0.041 |
| LNT | Personal-social | 24.61 (2.97-203.63)* | 0.003 |
| LNT | 2 or > domains | 0.10 (0.02-0.47) | 0.003 |
| LNH | Communication | 0.05 (0.004-0.53) | 0.014 |
| LNFPI | Gross motor Skills | 11.08 (0.15-796.37)* | 0.270 |
| LNFPII | Fine motor Skills | 0.03 (0.00-5.77) | 0.190 |
| DFLNT | Personal-social | 1.68 (0.24-11.63) | 0.600 |
| FLNH | Fine motor Skills | 0.12 (0.01-0.96) | 0.045 |
| DSLNT | Fine Motor Skills | 0.25 (0.10-0.65) | 0.005 |
| DSLNT | 2 or > domains | 0.55 (0.28-1.07) | 0.080 |
| DSLNH | Gross motor Skills | 10.78 (0.32-366.47)* | 0.190 |
| DSLNH | 2 or > domains | 1.54 (0.53-4.49) | 0.430 |
| Sia | Fine motor Skills | 0.00 (0.00- -+∞)* | 0.400 |
| Shannon | Communication | 0.26 (0.00-21.57) | 0.550 |
| Shannon | Gross motor Skills | 0.30 (0.01-6.26) | 0.440 |
| Shannon | 2 or > domains | 0.21 (0.05-0.78) | 0.019 |
| Simpson | Communication | 4.45 (0.00-+∞)* | 0.870 |
| Simpson | Gross motor Skills | 0.04 (0.00-1381.03)* | 0.540 |
| Simpson | Fine motor Skills | 0.00 (0.00-0.04)* | 0.017 |
| Simpson | 2 or > domains | 0.003 (0.00-0.13)* | 0.002 |

Note: ¹Subdistribution hazard ratio. ²Confidence interval. Bold values are significant (p-value =0.05). *Extreme coefficient values are considered not reliable. The adjusted models were performed based on Directed Acyclic Graph minimal sufficient adjustment set of variables: gestation weight gain adequacy, gestational age at birth, maternal age, parity, and pre-pregnancy BMI. DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-Ntetraose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNT, lacto-N-tetrose; 3FL,3-fucosyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose Sia, HMO-bound sialic acid.

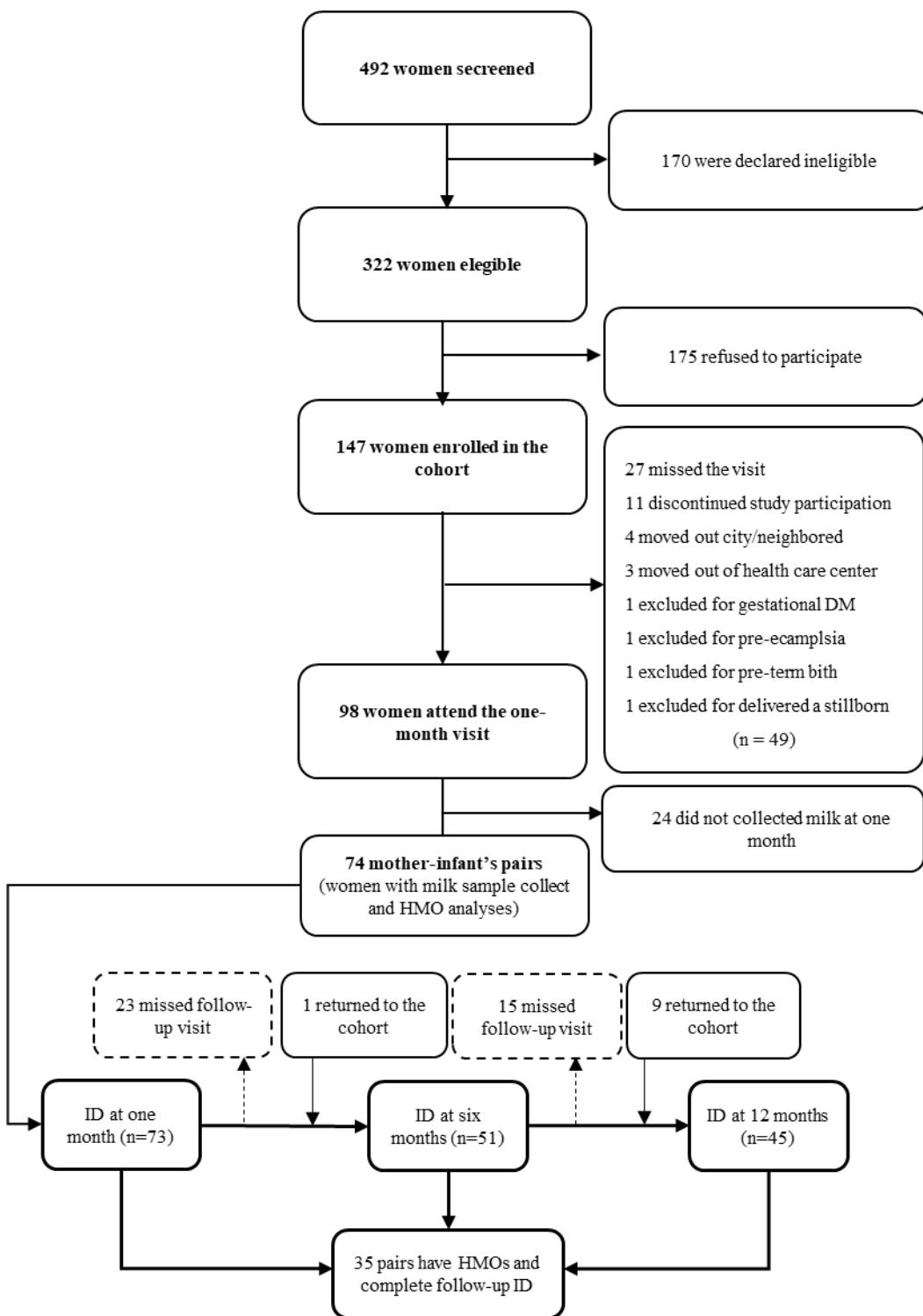


Figure 1. The flow of women milk samples and infants of the Brazilian cohort study, totaling 74 women with milk samples at 28-50 days postpartum.

Note: HMO: Human milk oligosaccharides; ID: infant development evaluated by Age & Stages Questionnaires.

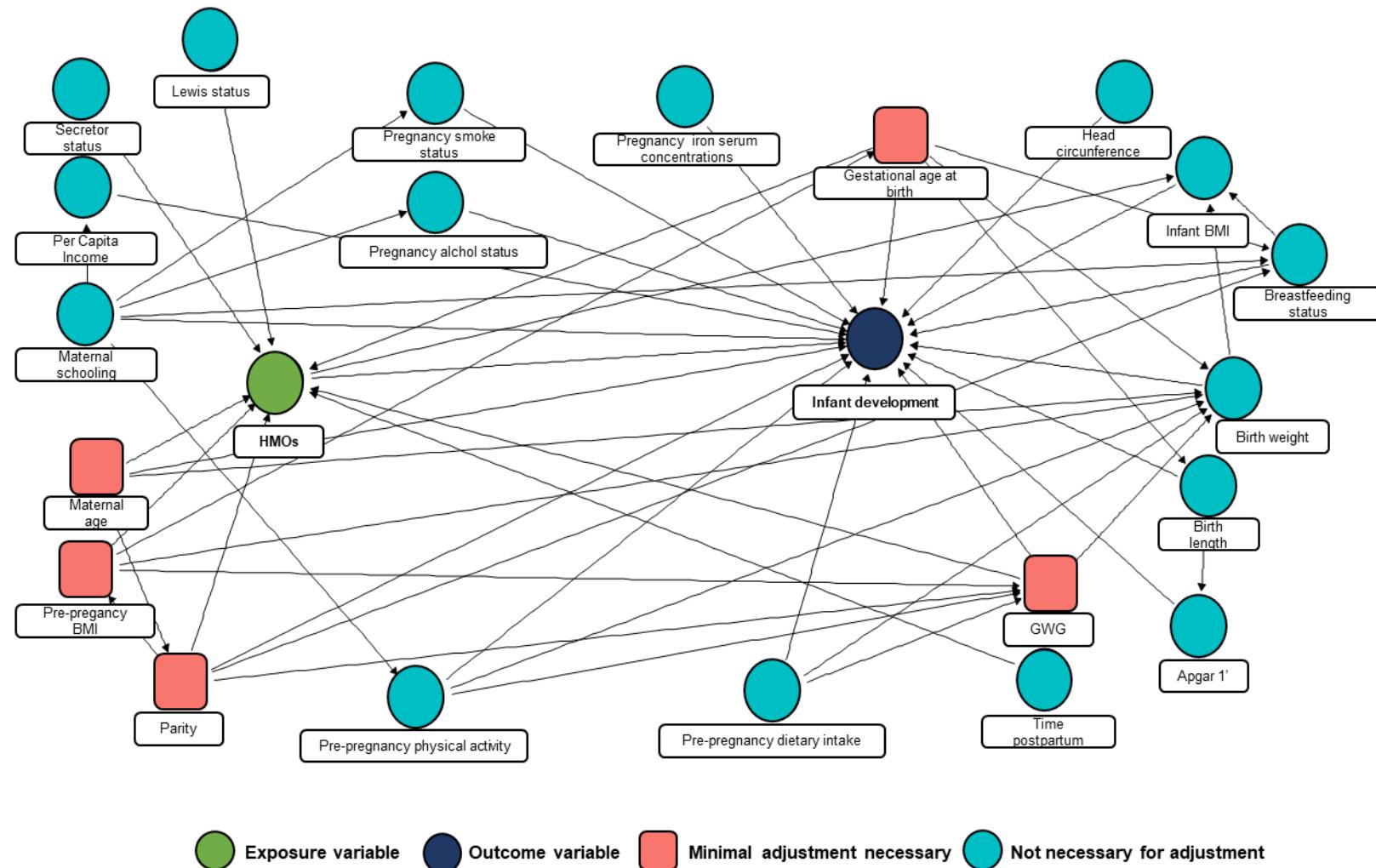


Figure 2. Study' theoretical model with a Directed Acyclic Graph (DAG) for minimal adjustment.

Note: BMI: body mass index; GWG: gestational weight gain; HMO: human milk oligosaccharides; labels with status indicate dichotomous yes/no variables.

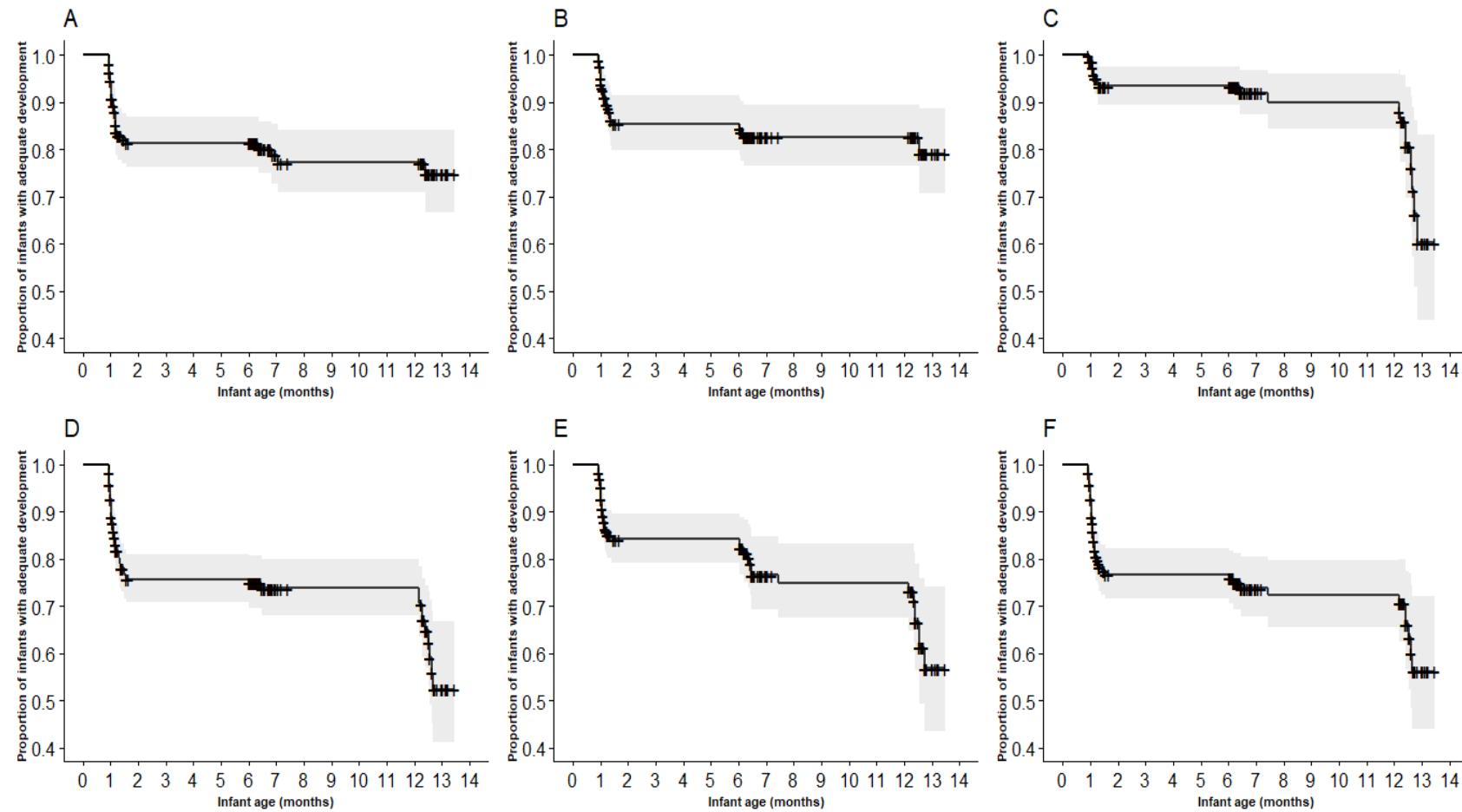


Figure 3. Kaplan-Meier curves for a cumulative proportion of infants with adequate development during the follow-up at **A: Communication**, **B: Gross motor skills**, **C: Fine motor skills**, **D: Problem-solving**, **E: Personal-social** **F: 2 or > domains**.

Note: Periods: one month (28-50 days, n=73), six months (181-223 days, n=53) and twelve months (365-404 days, n=44).

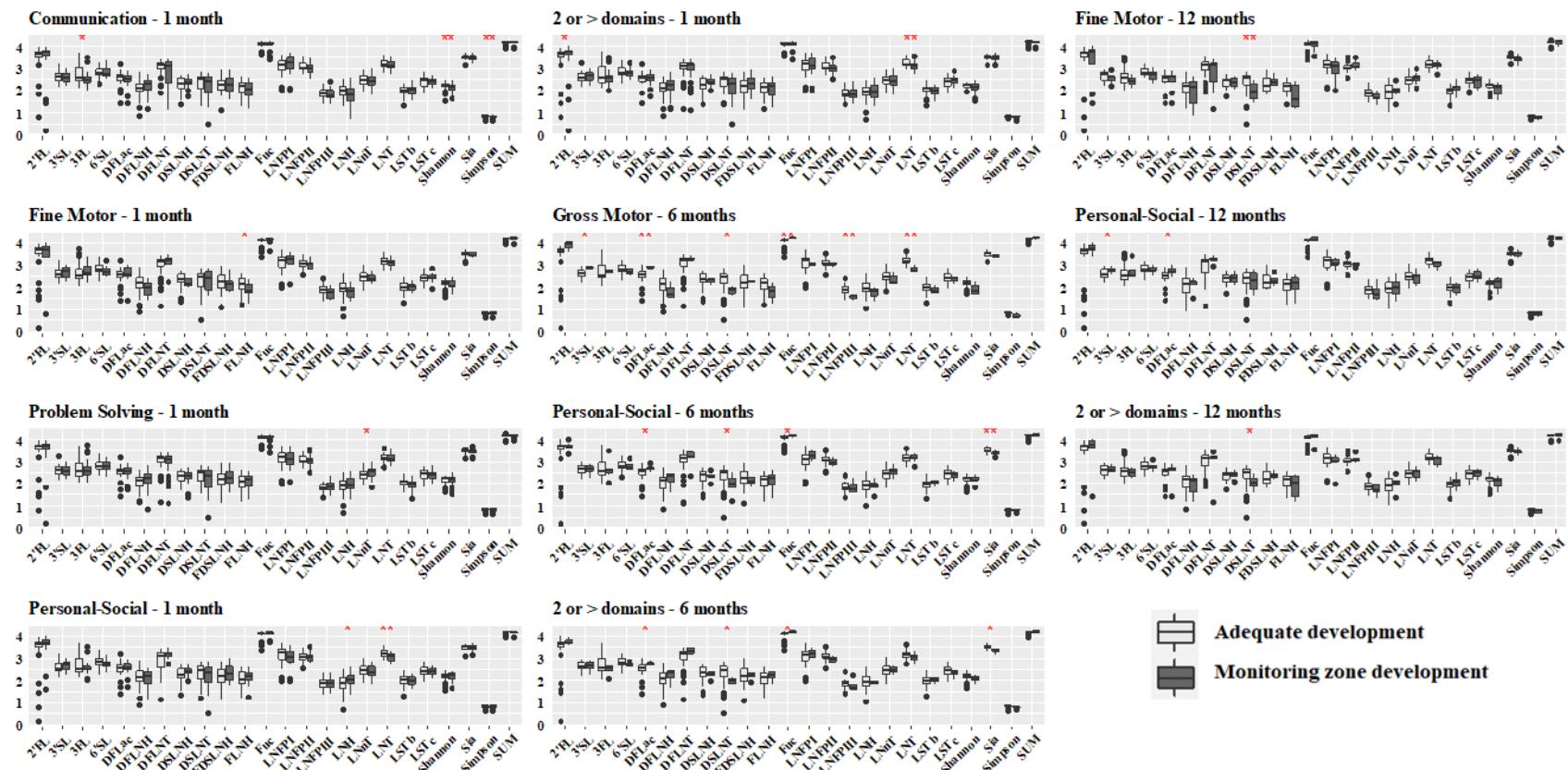


Figure 4. Box plot of human milk oligosaccharides concentration and alpha diversity stratified according to infant development adequacy at one month, six months, and twelve months.

Note: (*) Only plots for HMOs with statistically significant differences between infant development adequacy groups were presented. According to Mann-Whitney, $p < 0.05$. For complete analyses, view supplementary figures (1, 2, and 3). DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-N-tetraose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNT, lacto-N-tetrose; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose; Sia, HMO-bound sialic acid; Fuc, HMO-bound Fucose.

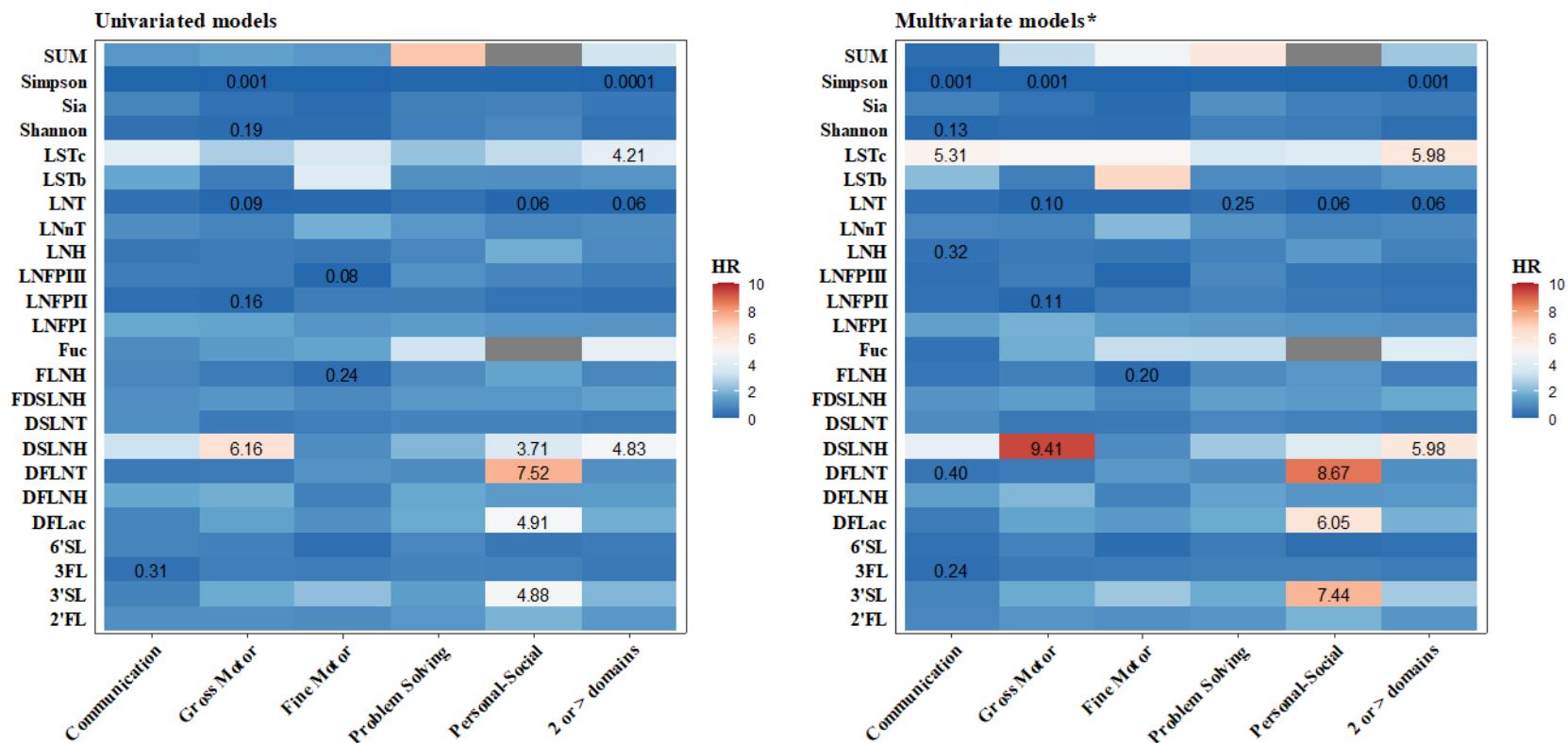


Figure 5. Heatmaps of cox regression hazard ratios between human milk oligosaccharides (HMO) concentrations and alpha diversity and longitudinal infant development domains based on Age & Stages Questionnaires (ASQ-BR).

Note: One-month N=73, six months N=52, twelve months N=44. HR: Hazards Ratio. Significant HR values are shown inside the box. The color intensity indicates a gradient for the HR value. The black box represents extreme coefficient values considered not reliable. * The adjusted models were performed based on Directed Acyclic Graph minimal sufficient adjustment set of variables: gestation weight gain adequacy, gestational age at birth, maternal age, parity, and pre-pregnancy BMI. DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-N-tetraose; FDSL NH, fucodisialyllacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNnT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetrose; LSTb, sialyl-lacto-N-tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3FL, 3-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose, Sia, HMO-bound sialic acid, Fuc, HMO-bound Fucose.

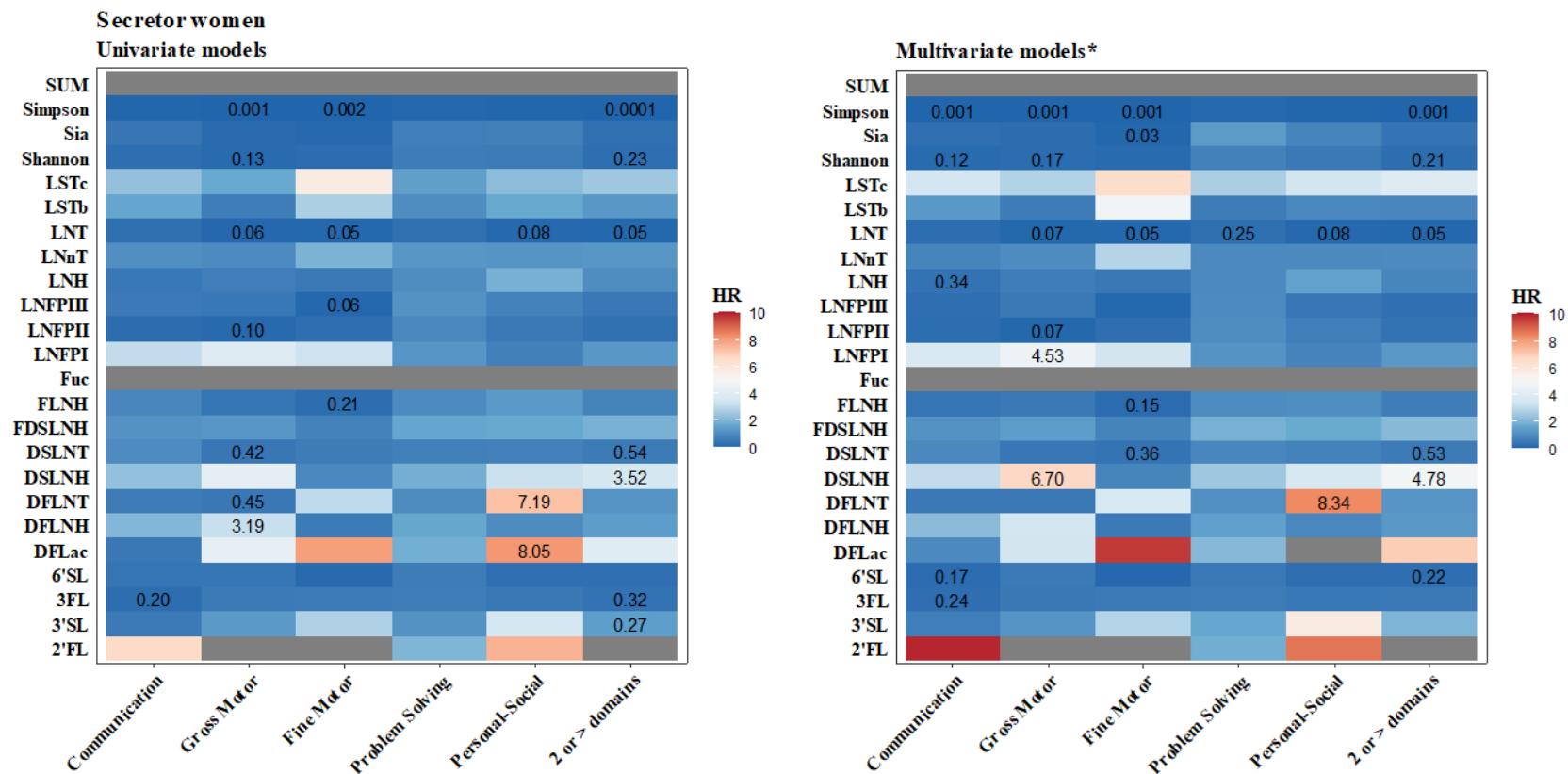
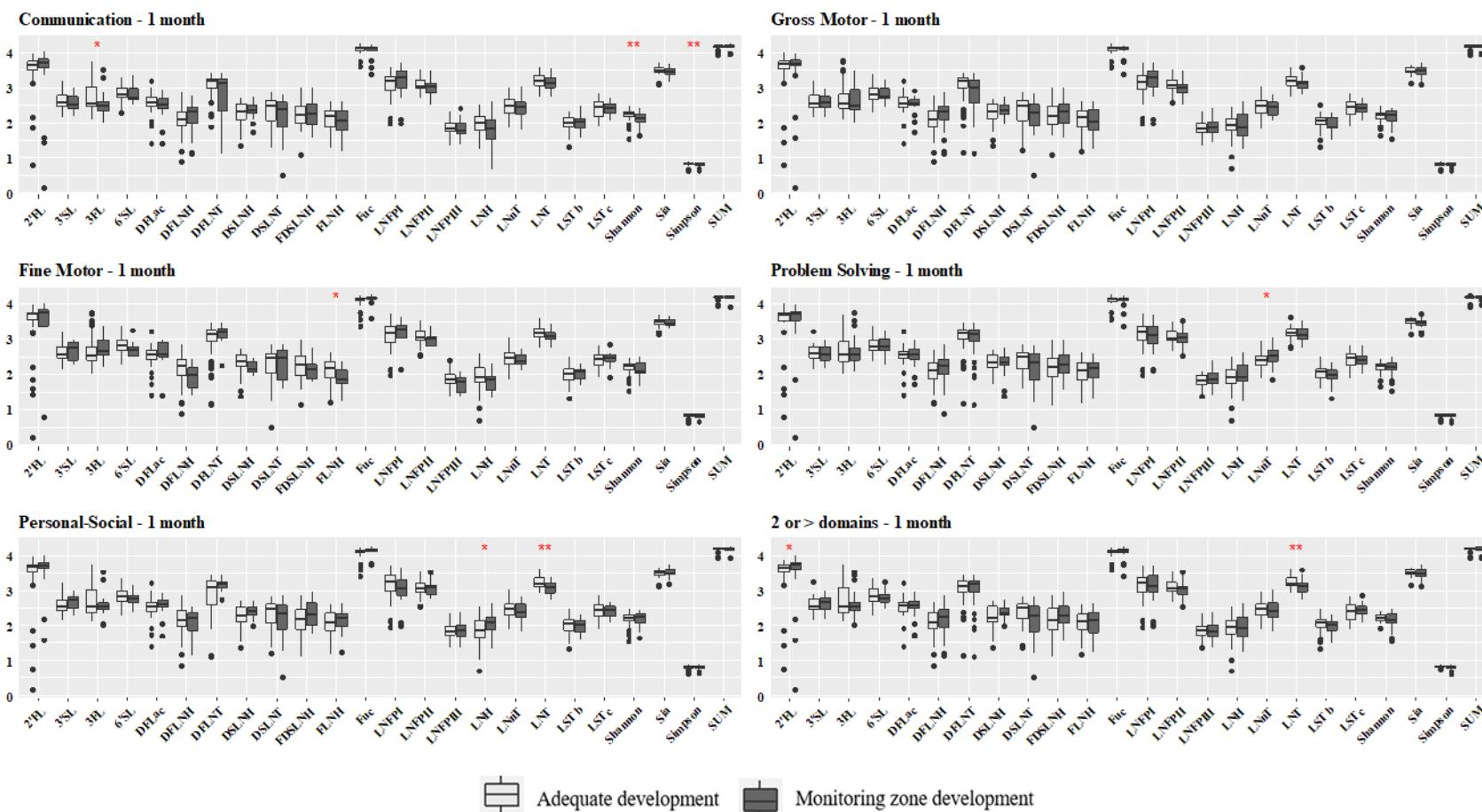


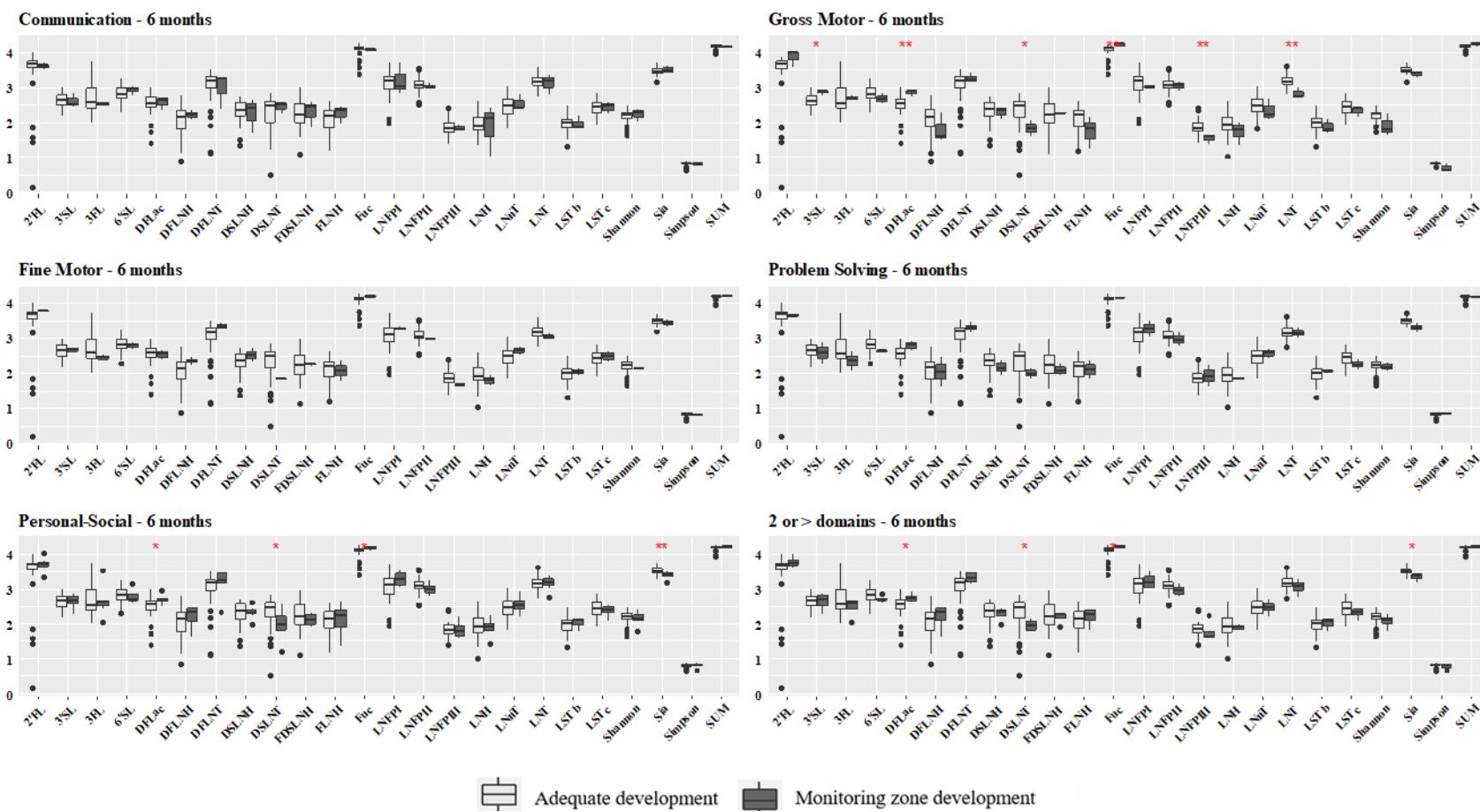
Figure 6. Secretor women heatmaps of cox regression hazard ratios between human milk oligosaccharides (HMO) concentrations and alpha diversity and longitudinal infant development domains based on Age & Stages Questionnaires (ASQ-BR). (one-month N=67, six months N=47, and twelve months N=40).

Note: HR: Hazards Ratio. Significant HR values are shown inside the box. The color intensity indicates a gradient for the HR value. The black box represents extreme coefficient values considered not reliable. *The adjusted models were performed based on Directed Acyclic Graph minimal sufficient adjustment set of variables: gestation weight gain adequacy, gestational age at birth, maternal age, parity, and pre-pregnancy BMI. DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-N-tetraose; FDSLNH, fucodisialyllacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNnT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetrose; LSTb, sialyl-lacto-N-tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3FL, 3-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose, Sia, HMO-bound sialic acid, Fuc, HMO-bound Fucose.



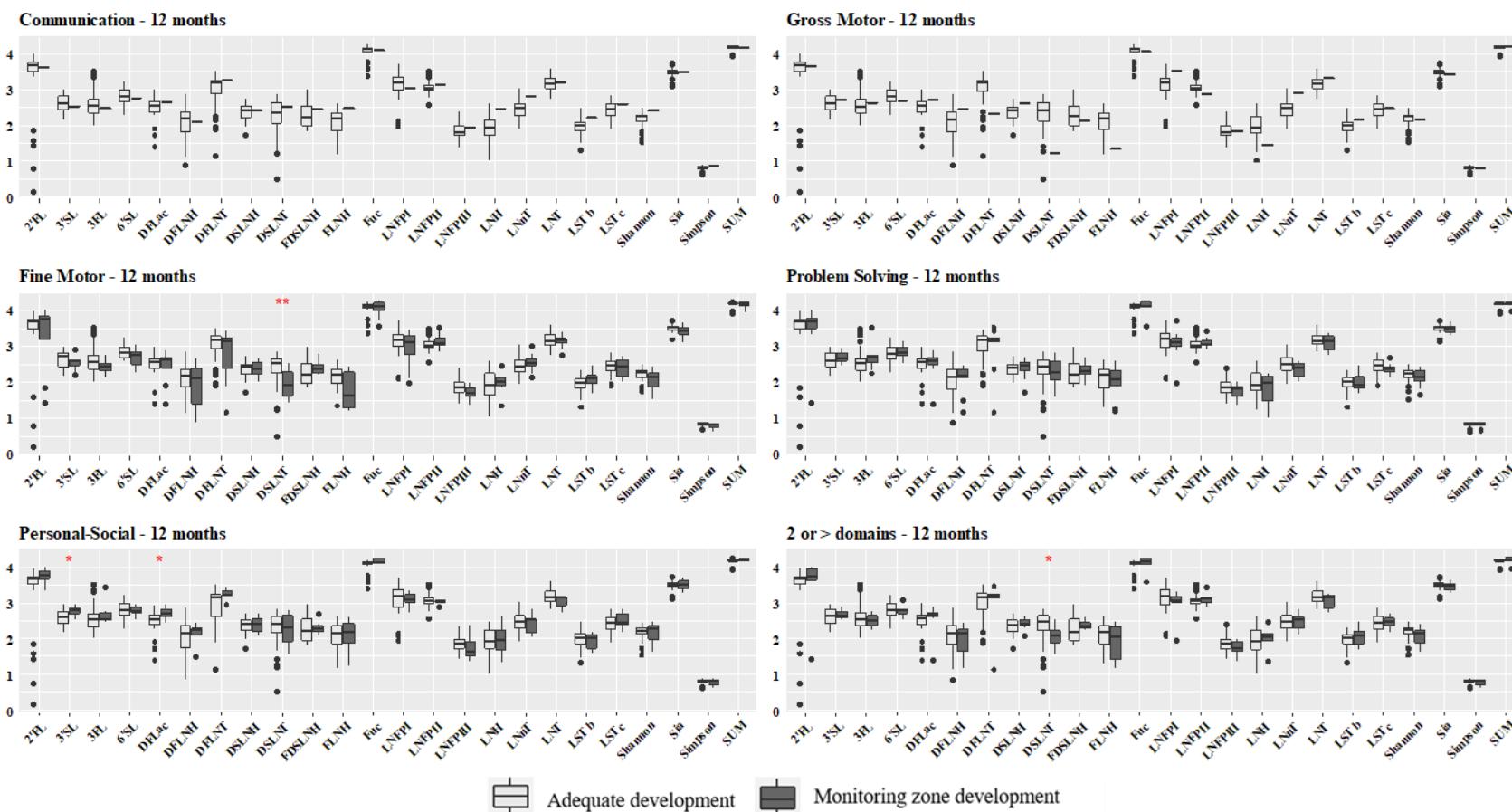
Supplementary Figure 1. Box plot of human milk oligosaccharides concentration and alpha diversity indexes stratified per infant development at one-month.

Note: Comparisons between groups were performed according to Mann–Whitney, (*) = $p < 0.05$ and (**) = $p < 0.01$. DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-N-tetraose; FDSLNH, fucodisialyllacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNNT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetrose; LSTb, sialyl-lacto-N-tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose, Sia, HMO-bound sialic acid, Fuc, HMO-bound Fucose.



Supplementary Figure 2. Box plot of human milk oligosaccharides concentration and alpha diversity indexes stratified per infant development at 6 months.

Note: The (*) description indicates differences between groups according to Mann–Whitney, $p < 0.05$. DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-Ntetraose; FDSLNH, fucodisialyllacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNNT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetrose; LSTb, sialyl-lacto-N-tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3'FL, 3'-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose, Sia, HMO-bound sialic acid, Fuc, HMO-bound Fucose.



Supplementary figure 3. Box plot of human milk oligosaccharides concentration and alpha diversity indexes stratified per infant development at 12 months.

Note: The (*) description indicates differences between groups according to Mann–Whitney, $p < 0.05$. DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-N-tetraose; FDSLNH, fucodisialyllacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNnT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetrose; LSTb, sialyl-lacto-N-tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3'FL, 3-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose, Sia, HMO-bound sialic acid, Fuc, HMO-bound Fucose.

Supplemental Table 1. Univariate Cox Regression models of associations between human milk oligosaccharides concentration and alpha diversity with longitudinal infant development.

| HMOs | Communication | | Gross motor skills | | Fine motor skills | | Problem-solving | | Personal-social | | 2 or > domains | | | | | | |
|---------|-----------------|------------------------|--------------------|-----------------|------------------------|--------------|-----------------|------------------------|-----------------|-----------------|------------------------|-------|-----------------|------------------------|--------------|------|---------------------------|
| | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | | |
| 2'FL | 1.04 | (0.60-1.79) | 0.895 | 1.05 | (0.57-1.95) | 0.879 | 0.97 | (0.66-1.42) | 0.876 | 1.22 | (0.75-2.00) | 0.423 | 1.92 | (0.83-4.46) | 0.127 | 1.25 | (0.70-2.22) 0.449 |
| 3FL | 0.31 | (0.12-0.79) | 0.014 | 0.61 | (0.28-1.33) | 0.217 | 0.58 | (0.23-1.44) | 0.239 | 0.74 | (0.37-1.46) | 0.387 | 0.68 | (0.30-1.54) | 0.353 | 0.48 | (0.23-1.00) 0.051 |
| DFLac | 0.77 | (0.27-2.19) | 0.621 | 1.49 | (0.42-5.26) | 0.536 | 1.04 | (0.32-3.39) | 0.953 | 1.70 | (0.67-4.36) | 0.267 | 4.91 | (1.30-18.53) | 0.019 | 1.81 | (0.59-5.49) 0.298 |
| 3'SL | 0.73 | (0.15-3.54) | 0.695 | 1.74 | (0.33-9.10) | 0.514 | 2.28 | (0.36-14.57) | 0.384 | 1.38 | (0.39-4.88) | 0.616 | 4.88 | (1.03-23.05) | 0.046 | 2.05 | (0.51-8.33) 0.313 |
| 6'SL | 0.76 | (0.19-2.95) | 0.686 | 0.67 | (0.17-2.64) | 0.565 | 0.22 | (0.04-1.22) | 0.084 | 0.81 | (0.31-2.13) | 0.670 | 0.45 | (0.11-1.78) | 0.257 | 0.53 | (0.16-1.74) 0.295 |
| LNT | 0.28 | (0.05-1.68) | 0.166 | 0.09 | (0.01-0.70) | 0.022 | 0.11 | (0.01-1.27) | 0.076 | 0.30 | (0.08-1.23) | 0.096 | 0.06 | (0.01-0.32) | 0.001 | 0.06 | (0.01-0.29) 0.000 |
| LNnT | 0.98 | (0.28-3.38) | 0.974 | 0.77 | (0.21-2.75) | 0.685 | 1.83 | (0.40-8.33) | 0.438 | 1.22 | (0.45-3.35) | 0.697 | 0.83 | (0.24-2.87) | 0.772 | 0.98 | (0.32-2.98) 0.967 |
| LNH | 0.45 | (0.15-1.29) | 0.136 | 0.56 | (0.22-1.42) | 0.222 | 0.48 | (0.12-2.01) | 0.316 | 0.82 | (0.40-1.66) | 0.580 | 1.79 | (0.70-4.59) | 0.226 | 0.92 | (0.43-1.96) 0.820 |
| LNFPI | 1.64 | (0.58-4.66) | 0.353 | 1.54 | (0.52-4.54) | 0.435 | 1.15 | (0.50-2.63) | 0.748 | 1.35 | (0.71-2.55) | 0.362 | 1.18 | (0.59-2.36) | 0.645 | 1.17 | (0.58-2.37) 0.665 |
| LNFPII | 0.23 | (0.04-1.25) | 0.088 | 0.16 | (0.03-0.78) | 0.024 | 0.58 | (0.13-2.64) | 0.485 | 0.59 | (0.17-2.04) | 0.409 | 0.37 | (0.09-1.49) | 0.162 | 0.29 | (0.07-1.16) 0.079 |
| LNFPIII | 0.58 | (0.12-2.75) | 0.495 | 0.57 | (0.10-3.14) | 0.520 | 0.08 | (0.01-0.96) | 0.046 | 1.08 | (0.31-3.70) | 0.907 | 0.78 | (0.12-5.15) | 0.793 | 0.56 | (0.12-2.66) 0.466 |
| DFLNT | 0.51 | (0.21-1.29) | 0.155 | 0.54 | (0.26-1.12) | 0.100 | 1.11 | (0.42-2.95) | 0.832 | 0.97 | (0.48-1.96) | 0.927 | 7.52 | (2.03-27.87) | 0.003 | 1.07 | (0.48-2.34) 0.874 |
| FLNH | 0.83 | (0.31-2.20) | 0.707 | 0.54 | (0.21-1.39) | 0.205 | 0.24 | (0.09-0.67) | 0.006 | 0.98 | (0.50-1.92) | 0.943 | 1.55 | (0.57-4.24) | 0.394 | 0.83 | (0.38-1.81) 0.638 |
| DFLNH | 1.61 | (0.67-3.88) | 0.285 | 1.81 | (0.73-4.46) | 0.199 | 0.67 | (0.31-1.44) | 0.305 | 1.64 | (0.88-3.06) | 0.122 | 1.34 | (0.59-3.07) | 0.481 | 1.35 | (0.67-2.74) 0.403 |
| LSTb | 1.61 | (0.37-7.00) | 0.522 | 0.58 | (0.15-2.28) | 0.438 | 3.99 | (0.63-25.40) | 0.143 | 1.06 | (0.36-3.14) | 0.915 | 1.04 | (0.26-4.13) | 0.958 | 1.17 | (0.34-4.01) 0.805 |
| LSTc | 4.08 | (0.88-18.81) | 0.072 | 2.71 | (0.60-12.28) | 0.197 | 3.63 | (0.44-30.05) | 0.232 | 2.37 | (0.70-7.98) | 0.164 | 3.09 | (0.79-12.09) | 0.105 | 4.21 | (1.07-16.54) 0.039 |
| DSLNT | 1.01 | (0.47-2.15) | 0.981 | 0.50 | (0.23-1.10) | 0.086 | 0.62 | (0.28-1.36) | 0.234 | 0.74 | (0.42-1.30) | 0.296 | 0.74 | (0.41-1.37) | 0.341 | 0.62 | (0.34-1.13) 0.117 |
| DSLNH | 3.27 | (0.60-17.91) | 0.172 | 6.16 | (1.34-28.36) | 0.020 | 0.98 | (0.21-4.53) | 0.975 | 2.04 | (0.75-5.59) | 0.164 | 3.71 | (1.03-13.41) | 0.046 | 4.83 | (1.41-16.57) 0.012 |
| FDSLNH | 1.01 | (0.42-2.42) | 0.984 | 1.18 | (0.51-2.76) | 0.698 | 0.90 | (0.38-2.13) | 0.804 | 1.21 | (0.59-2.51) | 0.604 | 1.22 | (0.54-2.72) | 0.632 | 1.46 | (0.69-3.10) 0.326 |
| SUM | 1.20 | (0.02-59.72) | 0.928 | 1.45 | (0.01-175.10) | 0.880 | 1.22 | (0.02-87.21) | 0.927 | 7.07 | (0.21-237.89) | 0.275 | 22.74* | (0.11-4924.99) | 0.255 | 3.42 | (0.05-243.11) 0.571 |

Supplemental Table 1. Univariate Cox Regression models of associations between human milk oligosaccharides concentration and alpha diversity with longitudinal infant development.

| HMOs | Communication | | Gross motor skills | | Fine motor skills | | Problem-solving | | Personal-social | | 2 or > domains | | | | | | |
|---------|-----------------|------------------------|--------------------|-----------------|------------------------|--------------|-----------------|------------------------|-----------------|-----------------|------------------------|-------|-----------------|------------------------|-------|------|--------------------------|
| | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | | |
| Sia | 0.76 | (0.04-13.16) | 0.852 | 0.30 | (0.01-6.35) | 0.440 | 0.15 | (0.01-2.14) | 0.160 | 0.64 | (0.05-7.86) | 0.729 | 0.70 | (0.04-12.01) | 0.804 | 0.46 | (0.04-5.04) 0.528 |
| Fuc | 0.97 | (0.07-13.40) | 0.984 | 1.32 | (0.05-33.91) | 0.867 | 1.55 | (0.09-27.74) | 0.765 | 3.34 | (0.25-44.29) | 0.361 | 84.14* | (0.49-+∞) | 0.091 | 4.30 | (0.14-129.83) 0.401 |
| Shannon | 0.26 | (0.04-1.64) | 0.152 | 0.19 | (0.04-0.89) | 0.035 | 0.18 | (0.02-1.29) | 0.088 | 0.62 | (0.17-2.27) | 0.469 | 0.81 | (0.08-8.44) | 0.863 | 0.30 | (0.07-1.34) 0.117 |
| Simpson | 0.01 | (0.00-2.56) | 0.102 | 0.001 | (0.00-0.07) | 0.001 | 0.002 | (0.00-1.30) | 0.060 | 0.06 | (0.00-3.07) | 0.164 | 0.03 | (0.00-23.15) | 0.297 | 0.00 | (0.00-0.37) 0.017 |

Note: ¹Hazards ratio. ²Confidence interval. Bold values are significant (p-value <0.05). *Extreme coefficient values considered not reliable. DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-N-tetraose; FDSLNH, fucodisialyllacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNnT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetrose; LSTb, sialyl-lacto-N-tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3FL, 3-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose Sia, HMO-bound sialic acid, Fuc, HMO-bound Fucose.

Supplemental Table 2. Multivariate Cox Regression models of associations between human milk oligosaccharides concentration and alpha diversity with longitudinal infant development.

| HMOs | Communication | | | Gross motor skills | | | Fine motor skills | | | Problem-solving | | | Personal-social | | | 2 or > domains | | |
|---------|-----------------|------------------------|--------------|--------------------|------------------------|--------------|-------------------|------------------------|--------------|-----------------|------------------------|--------------|-----------------|------------------------|--------------|-----------------|------------------------|--------------|
| | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P |
| 2'FL | 0.81 | (0.41-1.59) | 0.544 | 1.17 | (0.52-2.61) | 0.708 | 1.07 | (0.55-2.08) | 0.836 | 1.19 | (0.66-2.14) | 0.573 | 1.91 | (0.91-4.02) | 0.087 | 1.19 | (0.63-2.23) | 0.591 |
| 3FL | 0.24 | (0.07-0.85) | 0.027 | 0.51 | (0.20-1.26) | 0.143 | 0.56 | (0.18-1.71) | 0.307 | 0.64 | (0.28-1.46) | 0.291 | 0.63 | (0.25-1.56) | 0.317 | 0.54 | (0.22-1.34) | 0.185 |
| DFLac | 0.57 | (0.14-2.37) | 0.436 | 1.54 | (0.39-6.03) | 0.538 | 1.29 | (0.26-6.40) | 0.758 | 1.71 | (0.60-4.88) | 0.314 | 6.05 | (1.42-25.84) | 0.015 | 1.88 | (0.56-6.31) | 0.308 |
| 3'SL | 0.77 | (0.12-5.05) | 0.785 | 1.73 | (0.32-9.23) | 0.521 | 2.48 | (0.38-16.13) | 0.343 | 1.73 | (0.44-6.73) | 0.429 | 7.44 | (1.38-40.19) | 0.020 | 2.61 | (0.58-11.65) | 0.210 |
| 6'SL | 0.31 | (0.06-1.74) | 0.183 | 0.68 | (0.15-3.17) | 0.624 | 0.19 | (0.01-3.32) | 0.257 | 0.56 | (0.16-1.98) | 0.369 | 0.22 | (0.04-1.14) | 0.071 | 0.31 | (0.08-1.24) | 0.098 |
| LNT | 0.29 | (0.05-1.89) | 0.197 | 0.10 | (0.01-0.74) | 0.025 | 0.10 | (0.01-1.25) | 0.074 | 0.29 | (0.09-1.00) | 0.050 | 0.06 | (0.01-0.32) | 0.001 | 0.06 | (0.01-0.28) | 0.000 |
| LNnT | 0.81 | (0.22-2.97) | 0.745 | 0.77 | (0.20-3.02) | 0.707 | 2.11 | (0.28-15.83) | 0.467 | 1.10 | (0.38-3.15) | 0.862 | 0.76 | (0.19-3.09) | 0.703 | 0.88 | (0.26-2.90) | 0.829 |
| LNH | 0.32 | (0.14-0.75) | 0.009 | 0.52 | (0.18-1.47) | 0.214 | 0.43 | (0.07-2.53) | 0.349 | 0.72 | (0.33-1.60) | 0.420 | 1.27 | (0.42-3.84) | 0.672 | 0.68 | (0.30-1.55) | 0.362 |
| LNFPI | 1.46 | (0.46-4.62) | 0.522 | 1.87 | (0.61-5.77) | 0.275 | 1.39 | (0.45-4.33) | 0.567 | 1.27 | (0.58-2.79) | 0.546 | 1.15 | (0.53-2.48) | 0.721 | 1.09 | (0.49-2.42) | 0.833 |
| LNFPII | 0.30 | (0.06-1.53) | 0.147 | 0.11 | (0.02-0.74) | 0.023 | 0.49 | (0.08-2.90) | 0.434 | 0.68 | (0.18-2.55) | 0.570 | 0.47 | (0.13-1.67) | 0.245 | 0.36 | (0.09-1.37) | 0.133 |
| LNFPIII | 0.27 | (0.03-2.21) | 0.222 | 0.58 | (0.10-3.26) | 0.533 | 0.08 | (0.00-1.42) | 0.085 | 0.83 | (0.21-3.19) | 0.782 | 0.41 | (0.03-4.80) | 0.475 | 0.31 | (0.05-1.93) | 0.211 |
| DFLNT | 0.40 | (0.17-0.91) | 0.030 | 0.55 | (0.24-1.27) | 0.164 | 1.26 | (0.38-4.24) | 0.704 | 1.00 | (0.46-2.17) | 0.992 | 8.67 | (1.77-42.40) | 0.008 | 1.03 | (0.45-2.36) | 0.952 |
| FLNH | 0.43 | (0.13-1.44) | 0.170 | 0.63 | (0.22-1.79) | 0.383 | 0.20 | (0.06-0.73) | 0.015 | 0.96 | (0.40-2.29) | 0.926 | 1.22 | (0.39-3.80) | 0.727 | 0.65 | (0.26-1.65) | 0.367 |
| DFLNH | 1.40 | (0.54-3.63) | 0.489 | 2.04 | (0.79-5.27) | 0.143 | 0.72 | (0.25-2.11) | 0.553 | 1.51 | (0.70-3.22) | 0.290 | 1.19 | (0.49-2.87) | 0.706 | 1.22 | (0.56-2.67) | 0.619 |
| LSTb | 2.17 | (0.31-15.26) | 0.435 | 0.64 | (0.13-3.24) | 0.589 | 6.70 | (0.79-56.70) | 0.081 | 0.92 | (0.24-3.51) | 0.898 | 0.80 | (0.13-5.08) | 0.813 | 1.18 | (0.26-5.41) | 0.830 |
| LSTc | 5.31 | (0.92-30.56) | 0.061 | 5.13 | (0.96-27.50) | 0.056 | 5.12 | (0.54-48.76) | 0.155 | 3.63 | (0.91-14.42) | 0.067 | 3.96 | (0.85-18.49) | 0.080 | 5.98 | (1.28-28.01) | 0.023 |
| DSLNT | 0.96 | (0.42-2.23) | 0.932 | 0.48 | (0.16-1.43) | 0.190 | 0.52 | (0.23-1.19) | 0.121 | 0.82 | (0.42-1.63) | 0.579 | 0.69 | (0.36-1.32) | 0.262 | 0.57 | (0.30-1.07) | 0.081 |
| DSLNH | 4.24 | (0.71-25.38) | 0.114 | 9.41 | (2.22-39.88) | 0.002 | 0.94 | (0.16-5.69) | 0.948 | 2.53 | (0.93-6.91) | 0.069 | 3.88 | (0.98-15.42) | 0.054 | 5.89 | (1.61-21.54) | 0.007 |
| FDSLNH | 1.13 | (0.48-2.66) | 0.775 | 1.37 | (0.53-3.52) | 0.516 | 0.81 | (0.29-2.23) | 0.678 | 1.42 | (0.62-3.27) | 0.405 | 1.31 | (0.60-2.87) | 0.504 | 1.68 | (0.76-3.71) | 0.199 |
| SUM | 0.20 | (0.00-31.89) | 0.535 | 3.10 | (0.01-871.61) | 0.694 | 4.75 | (0.01-2913.02) | 0.634 | 5.95 | (0.08-456.73) | 0.420 | 24.91* | (0.14-4473.87) | 0.225 | 2.52 | (0.02-267.92) | 0.698 |

Supplemental Table 2. Multivariate Cox Regression models of associations between human milk oligosaccharides concentration and alpha diversity with longitudinal infant development.

| HMOs | Communication | | | Gross motor skills | | | Fine motor skills | | | Problem-solving | | | Personal-social | | | 2 or > domains | | |
|---------|-----------------|------------------------|--------------|--------------------|------------------------|--------------|-------------------|------------------------|-------|-----------------|------------------------|-------|-----------------|------------------------|-------|-----------------|------------------------|--------------|
| | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P |
| Sia | 0.68 | (0.02-20.22) | 0.825 | 0.36 | (0.02-5.52) | 0.465 | 0.12 | (0.01-2.21) | 0.152 | 1.06 | (0.07-16.24) | 0.968 | 0.61 | (0.03-11.64) | 0.742 | 0.52 | (0.04-6.42) | 0.610 |
| Fuc | 0.33 | (0.01-9.56) | 0.522 | 1.81 | (0.04-82.08) | 0.762 | 3.15 | (0.05-189.79) | 0.583 | 3.12 | (0.16-60.21) | 0.452 | 105.88* | (0.68-16561.68) | 0.071 | 3.96 | (0.09-179.52) | 0.479 |
| Shannon | 0.13 | (0.02-0.80) | 0.028 | 0.20 | (0.04-1.05) | 0.057 | 0.17 | (0.02-1.47) | 0.106 | 0.63 | (0.15-2.60) | 0.527 | 0.55 | (0.06-4.70) | 0.581 | 0.23 | (0.05-1.02) | 0.053 |
| Simpson | 0.001 | (0.00-0.29) | 0.016 | 0.00 | (0.00-0.13) | 0.005 | 0.00 | (0.00-1.88) | 0.075 | 0.05 | (0.00-1.98) | 0.112 | 0.01 | (0.00-2.78) | 0.106 | 0.001 | (0.00-0.11) | 0.003 |

Note: ¹Hazards ratio. ²Confidence interval. Bold values are significant (p-value =0.05). *Extreme coefficient values are considered not reliable. The adjusted models were performed based on Directed Acyclic Graph minimal sufficient adjustment set of variables: gestation weight gain adequacy, gestational age at birth, maternal age, parity, and pre-pregnancy BMI. DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-Ntetraose; FDSLNH, fucodisialyllacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNNT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetrose; LSTb, sialyl-lacto-N-tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3FL, 3-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose Sia, HMO-bound sialic acid, Fuc, HMO-bound Fucose.

Supplemental Table 3. Univariate Cox Regression models of associations between human milk oligosaccharides concentrations and alpha diversity of secretor mothers with longitudinal infant development.

| HMOs | Communication | | | Gross motor skills | | | Fine motor skills | | | Problem-solving | | | Personal-social | | | 2 or > domains | | | |
|---------|-----------------|------------------------|--------------|--------------------|------------------------|--------------|-------------------|------------------------|--------------|-----------------|------------------------|-------|-----------------|------------------------|--------------|-----------------|------------------------|--------------|--|
| | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | |
| 2'FL | 6.65 | (0.64-68.67) | 0.112 | 36.33* | (2.26-585.19) | 0.011 | 21.79* | (0.40-1195.95) | 0.132 | 2.02 | (0.44-9.20) | 0.362 | 7.51 | (0.52-108.02) | 0.138 | 17.32* | (1.99-150.57) | 0.010 | |
| 3FL | 0.20 | (0.06-0.69) | 0.011 | 0.51 | (0.19-1.35) | 0.174 | 0.55 | (0.18-1.69) | 0.300 | 0.59 | (0.27-1.33) | 0.205 | 0.45 | (0.16-1.27) | 0.132 | 0.32 | (0.13-0.80) | 0.014 | |
| DFLac | 0.45 | (0.04-5.56) | 0.536 | 4.28 | (0.49-37.42) | 0.189 | 7.90 | (0.60-103.93) | 0.116 | 1.83 | (0.38-8.77) | 0.452 | 8.05 | (1.50-43.33) | 0.015 | 4.00 | (0.67-24.01) | 0.130 | |
| 3'SL | 0.50 | (0.09-2.88) | 0.437 | 1.31 | (0.21-8.11) | 0.774 | 2.79 | (0.30-26.15) | 0.368 | 1.10 | (0.28-4.31) | 0.892 | 3.52 | (0.68-18.29) | 0.134 | 1.41 | (0.31-6.36) | 0.658 | |
| 6'SL | 0.38 | (0.08-1.78) | 0.218 | 0.41 | (0.09-1.99) | 0.270 | 0.11 | (0.01-1.16) | 0.066 | 0.56 | (0.18-1.69) | 0.300 | 0.27 | (0.06-1.19) | 0.084 | 0.27 | (0.07-0.97) | 0.044 | |
| LNT | 0.25 | (0.04-1.54) | 0.136 | 0.06 | (0.0-1-0.47) | 0.008 | 0.05 | (0.00-0.93) | 0.044 | 0.28 | (0.07-1.19) | 0.084 | 0.08 | (0.01-0.50) | 0.007 | 0.05 | (0.01-0.25) | 0.000 | |
| LNnT | 1.05 | (0.28-3.98) | 0.939 | 0.92 | (0.24-3.57) | 0.902 | 1.96 | (0.30-12.61) | 0.479 | 1.20 | (0.40-3.56) | 0.743 | 1.16 | (0.33-4.08) | 0.819 | 1.20 | (0.38-3.82) | 0.761 | |
| LNH | 0.46 | (0.15-1.43) | 0.180 | 0.60 | (0.22-1.67) | 0.331 | 0.47 | (0.11-2.12) | 0.328 | 0.98 | (0.48-1.98) | 0.946 | 1.87 | (0.72-4.87) | 0.201 | 1.00 | (0.45-2.23) | 0.999 | |
| LNFPI | 3.10 | (0.70-13.67) | 0.136 | 3.92 | (0.93-16.60) | 0.063 | 3.28 | (0.67-16.17) | 0.144 | 1.18 | (0.46-3.02) | 0.726 | 0.66 | (0.24-1.86) | 0.436 | 1.25 | (0.45-3.50) | 0.673 | |
| LNFPII | 0.18 | (0.02-1.39) | 0.100 | 0.10 | (0.02-0.62) | 0.013 | 0.23 | (0.04-1.55) | 0.133 | 0.83 | (0.20-3.48) | 0.799 | 0.49 | (0.09-2.59) | 0.404 | 0.28 | (0.05-1.46) | 0.130 | |
| LNFPIII | 0.51 | (0.10-2.49) | 0.407 | 0.46 | (0.08-2.56) | 0.372 | 0.06 | (0.00-0.74) | 0.028 | 1.12 | (0.32-3.91) | 0.860 | 0.71 | (0.12-4.30) | 0.705 | 0.45 | (0.09-2.23) | 0.331 | |
| DFLNT | 0.56 | (0.18-1.75) | 0.316 | 0.45 | (0.23-0.91) | 0.026 | 3.03 | (0.31-30.08) | 0.343 | 0.97 | (0.40-2.38) | 0.954 | 7.19 | (1.39-37.20) | 0.019 | 1.15 | (0.42-3.14) | 0.789 | |
| FLNH | 0.82 | (0.30-2.24) | 0.704 | 0.39 | (0.15-1.05) | 0.063 | 0.21 | (0.06-0.75) | 0.017 | 0.92 | (0.43-1.97) | 0.835 | 1.31 | (0.44-3.87) | 0.623 | 0.73 | (0.32-1.66) | 0.454 | |
| DFLNH | 2.07 | (0.61-6.99) | 0.240 | 3.19 | (1.04-9.82) | 0.043 | 0.53 | (0.09-3.10) | 0.484 | 1.63 | (0.68-3.88) | 0.270 | 0.96 | (0.29-3.23) | 0.948 | 1.37 | (0.49-3.83) | 0.546 | |
| LSTb | 1.59 | (0.35-7.31) | 0.551 | 0.59 | (0.14-2.50) | 0.469 | 2.72 | (0.29-25.58) | 0.381 | 1.00 | (0.31-3.19) | 1.000 | 1.66 | (0.36-7.63) | 0.514 | 1.23 | (0.32-4.67) | 0.763 | |
| LSTc | 2.33 | (0.40-13.46) | 0.345 | 1.68 | (0.30-9.34) | 0.551 | 5.73 | (0.28-115.69) | 0.255 | 1.43 | (0.36-5.69) | 0.611 | 2.21 | (0.48-10.26) | 0.312 | 2.52 | (0.52-12.13) | 0.249 | |
| DSLNT | 0.94 | (0.43-2.08) | 0.884 | 0.42 | (0.19-0.91) | 0.028 | 0.56 | (0.23-1.34) | 0.192 | 0.67 | (0.38-1.18) | 0.165 | 0.70 | (0.40-1.24) | 0.224 | 0.54 | (0.30-0.97) | 0.038 | |
| DSLNH | 2.31 | (0.47-11.27) | 0.300 | 4.15 | (0.97-17.83) | 0.056 | 0.84 | (0.17-4.17) | 0.836 | 1.85 | (0.71-4.85) | 0.209 | 3.23 | (0.97-10.79) | 0.056 | 3.52 | (1.09-11.37) | 0.036 | |
| FDSLNH | 1.10 | (0.39-3.08) | 0.859 | 1.22 | (0.43-3.46) | 0.703 | 0.72 | (0.26-1.97) | 0.517 | 1.60 | (0.73-3.51) | 0.240 | 1.66 | (0.68-4.10) | 0.268 | 1.90 | (0.80-4.51) | 0.148 | |
| SUM | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sia | 0.40 | (0.02-6.97) | 0.533 | 0.14 | (0.01-2.71) | 0.192 | 0.08 | (0.01-1.13) | 0.061 | 0.62 | (0.05-8.01) | 0.711 | 0.66 | (0.04-10.78) | 0.769 | 0.28 | (0.03-3.07) | 0.296 | |

Supplemental Table 3. Univariate Cox Regression models of associations between human milk oligosaccharides concentrations and alpha diversity of secretor mothers with longitudinal infant development.

| HMOs | Communication | | | | Gross motor skills | | | | Fine motor skills | | | | Problem-solving | | | | Personal-social | | | | 2 or > domains | | | |
|---------|-----------------|------------------------|-------|-----------------|------------------------|--------------|-----------------|------------------------|-------------------|-----------------|------------------------|-------|-----------------|------------------------|-------|-----------------|------------------------|--------------|-----------------|------------------------|----------------|--|--|--|
| | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | | | |
| Fuc | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Shannon | 0.23 | (0.03-1.49) | 0.123 | 0.13 | (0.03-0.57) | 0.007 | 0.17 | (0.02-1.23) | 0.078 | 0.56 | (0.15-1.99) | 0.367 | 0.54 | (0.07-4.40) | 0.568 | 0.23 | (0.05-0.97) | 0.045 | | | | | | |
| Simpson | 0.01 | (0.00-2.53) | 0.100 | 0.001 | (0.00-0.04) | 0.001 | 0.002 | (0.00-0.89) | 0.046 | 0.06 | (0.00-2.55) | 0.141 | 0.02 | (0.00-9.33) | 0.208 | 0.00 | (0.00-0.24) | 0.010 | | | | | | |

Note: ¹Hazards ratio. ²Confidence interval. Bold values are significant (p-value =0.05). * Extreme coefficient values considered not reliable. DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialylacto-N-hexaose; DSLNT, disialylacto-Ntetraose; FDSLNH, fucodisialylacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNNT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetrose; LSTb, sialyl-lacto-N-tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3FL,3-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose Sia, HMO-bound sialic acid, Fuc, HMO-bound Fucose.

Supplemental Table 4. Multivariate Cox Regression models of associations between human milk oligosaccharides concentration and alpha diversity of secretor mothers with longitudinal infant development.

| HMOs | Communication | | | Gross motor skills | | | Fine motor skills | | | Problem-solving | | | Personal-social | | | 2 or > domains | | | |
|---------|-----------------|------------------------|--------------|--------------------|------------------------|--------------|-------------------|------------------------|--------------|-----------------|------------------------|--------------|-----------------|------------------------|--------------|-----------------|------------------------|--------------|--|
| | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | |
| 2'FL | 9.87 | (0.90-108.48) | 0.061 | 27.05* | (2.17-337.50) | 0.010 | 22.80* | 0.42-1252.27) | 0.126 | 1.80 | (0.46-7.03) | 0.395 | 8.68 | (0.80-94.42) | 0.076 | 17.78* | (2.18-144.92) | 0.007 | |
| 3FL | 0.24 | (0.06-0.97) | 0.045 | 0.45 | (0.16-1.27) | 0.129 | 0.50 | (0.16-1.55) | 0.231 | 0.56 | (0.22-1.39) | 0.209 | 0.46 | (0.15-1.36) | 0.160 | 0.49 | (0.18-1.31) | 0.154 | |
| DFLac | 0.89 | (0.05-17.69) | 0.941 | 3.41 | (0.28-41.58) | 0.336 | 9.62 | (0.43-214.17) | 0.153 | 2.12 | (0.39-11.68) | 0.386 | 13.76* | (1.97-96.13) | 0.008 | 6.93 | (0.92-51.96) | 0.060 | |
| 3'SL | 0.62 | (0.08-4.93) | 0.652 | 1.16 | (0.18-7.39) | 0.876 | 2.83 | (0.26-31.26) | 0.396 | 1.62 | (0.37-7.11) | 0.519 | 5.73 | (0.97-33.69) | 0.053 | 1.99 | (0.38-10.37) | 0.413 | |
| 6'SL | 0.17 | (0.03-0.96) | 0.044 | 0.50 | (0.10-2.53) | 0.401 | 0.06 | (0.00-1.55) | 0.090 | 0.49 | (0.13-1.85) | 0.293 | 0.22 | (0.04-1.15) | 0.073 | 0.22 | (0.05-0.92) | 0.038 | |
| LNT | 0.21 | (0.03-1.31) | 0.094 | 0.07 | (0.01-0.55) | 0.011 | 0.05 | (0.00-0.82) | 0.036 | 0.25 | (0.07-0.86) | 0.028 | 0.08 | (0.01-0.44) | 0.004 | 0.05 | (0.01-0.21) | 0.000 | |
| LNnT | 0.77 | (0.19-3.01) | 0.702 | 0.94 | (0.22-3.94) | 0.928 | 2.88 | (0.25-32.99) | 0.395 | 0.90 | (0.31-2.66) | 0.852 | 0.89 | (0.22-3.51) | 0.862 | 0.92 | (0.26-3.21) | 0.893 | |
| LNH | 0.34 | (0.14-0.84) | 0.020 | 0.59 | (0.19-1.80) | 0.352 | 0.44 | (0.08-2.44) | 0.344 | 0.89 | (0.40-2.02) | 0.789 | 1.51 | (0.49-4.66) | 0.471 | 0.79 | (0.34-1.86) | 0.594 | |
| LNFPI | 3.66 | (0.88-15.29) | 0.075 | 4.53 | (1.04-19.84) | 0.045 | 3.40 | (0.50-23.27) | 0.213 | 1.14 | (0.42-3.09) | 0.790 | 0.75 | (0.26-2.18) | 0.596 | 1.27 | (0.42-3.83) | 0.677 | |
| LNFPII | 0.20 | (0.03-1.33) | 0.095 | 0.07 | (0.01-0.72) | 0.025 | 0.24 | (0.03-1.99) | 0.187 | 0.98 | (0.24-4.07) | 0.978 | 0.62 | (0.14-2.84) | 0.538 | 0.34 | (0.06-1.81) | 0.206 | |
| LNFPIII | 0.22 | (0.02-2.15) | 0.191 | 0.48 | (0.08-2.76) | 0.412 | 0.04 | (0.00-1.16) | 0.061 | 0.91 | (0.25-3.35) | 0.884 | 0.42 | (0.04-4.55) | 0.479 | 0.27 | (0.04-1.80) | 0.177 | |
| DFLNT | 0.47 | (0.16-1.41) | 0.178 | 0.47 | (0.21-1.05) | 0.065 | 3.69 | (0.23-60.36) | 0.360 | 1.07 | (0.38-2.99) | 0.894 | 8.34 | (1.09-63.87) | 0.041 | 1.19 | (0.39-3.64) | 0.762 | |
| FLNH | 0.39 | (0.11-1.35) | 0.137 | 0.48 | (0.17-1.37) | 0.170 | 0.15 | (0.03-0.65) | 0.012 | 0.95 | (0.38-2.36) | 0.904 | 1.02 | (0.29-3.62) | 0.970 | 0.58 | (0.22-1.56) | 0.283 | |
| DFLNH | 2.19 | (0.63-7.53) | 0.215 | 3.45 | (0.93-12.70) | 0.063 | 0.50 | (0.07-3.82) | 0.507 | 1.46 | (0.56-3.85) | 0.440 | 0.84 | (0.23-3.02) | 0.787 | 1.29 | (0.40-4.16) | 0.668 | |
| LSTb | 1.28 | (0.17-9.45) | 0.811 | 0.57 | (0.10-3.23) | 0.525 | 4.73 | (0.46-48.89) | 0.192 | 0.57 | (0.14-2.36) | 0.441 | 0.85 | (0.11-6.55) | 0.875 | 0.81 | (0.15-4.41) | 0.803 | |
| LSTc | 3.47 | (0.52-23.24) | 0.200 | 2.82 | (0.43-18.63) | 0.281 | 6.51 | (0.34-125.45) | 0.214 | 2.70 | (0.54-13.46) | 0.225 | 3.43 | (0.63-18.87) | 0.156 | 3.93 | (0.67-23.20) | 0.131 | |
| DSLNT | 0.86 | (0.37-1.97) | 0.714 | 0.42 | (0.15-1.23) | 0.115 | 0.36 | (0.14-0.90) | 0.029 | 0.81 | (0.40-1.64) | 0.563 | 0.71 | (0.37-1.35) | 0.299 | 0.53 | (0.28-0.98) | 0.041 | |
| DSLNH | 3.08 | (0.52-18.30) | 0.217 | 6.70 | (1.56-28.85) | 0.011 | 0.77 | (0.13-4.71) | 0.781 | 2.52 | (0.88-7.24) | 0.086 | 3.65 | (0.96-13.95) | 0.058 | 4.78 | (1.31-17.41) | 0.018 | |
| FDSLNH | 1.10 | (0.38-3.21) | 0.864 | 1.38 | (0.42-4.51) | 0.591 | 0.73 | (0.22-2.40) | 0.599 | 1.89 | (0.81-4.38) | 0.140 | 1.69 | (0.72-3.96) | 0.228 | 2.14 | (0.87-5.23) | 0.096 | |
| SUM | * | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Supplemental Table 4. Multivariate Cox Regression models of associations between human milk oligosaccharides concentration and alpha diversity of secretor mothers with longitudinal infant development.

| HMOs | Communication | | | | Gross motor skills | | | | Fine motor skills | | | | Problem-solving | | | | Personal-social | | | | 2 or > domains | | | | |
|---------|-----------------|------------------------|--------------|-----------------|------------------------|--------------|-----------------|------------------------|-------------------|-----------------|------------------------|-------|-----------------|------------------------|-------|-----------------|------------------------|--------------|-----------------|------------------------|----------------|-----------------|------------------------|---|--|
| | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | HR ¹ | (95% CI ²) | P | |
| Sai | 0.260 | (0.01-7.77) | 0.433 | 0.19 | (0.01-2.85) | 0.227 | 0.03 | (0.00-0.65) | 0.026 | 1.34 | (0.09-20.61) | 0.836 | 0.77 | (0.04-15.90) | 0.868 | 0.36 | (0.03-4.87) | 0.442 | | | | | | | |
| Fuc | | | | | | | | | * | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Shannon | 0.120 | (0.02-0.74) | 0.023 | 0.17 | (0.03-0.87) | 0.033 | 0.13 | (0.02-1.10) | 0.061 | 0.68 | (0.17-2.72) | 0.590 | 0.47 | (0.07-3.31) | 0.445 | 0.21 | (0.05-0.91) | 0.037 | | | | | | | |
| Simpson | 0.001 | (0.00-0.24) | 0.014 | 0.00 | (0.00-0.19) | 0.009 | 0.00 | (0.00-0.74) | 0.041 | 0.08 | (0.00-3.01) | 0.172 | 0.01 | (0.00-2.45) | 0.100 | 0.001 | (0.00-0.12) | 0.004 | | | | | | | |

Note: ¹Hazards ratio. ²Confidence interval. Bold values are significant (p-value =0.05). * Extreme coefficient values are considered not reliable. The adjusted models were performed based on Directed Acyclic Graph minimal sufficient adjustment set of variables: gestation weight gain adequacy, gestational age at birth, maternal age, parity, and pre-pregnancy BMI. DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-N-tetraose; FDSLNH, fucodisialyllacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNnT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetrose; LSTb, sialyl-lacto-N-tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3FL, 3-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose Sia, HMO-bound sialic acid, Fuc, HMO-bound Fucose.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A composição dos OLH é fortemente determinada por fatores genéticos, como o status secretor materno. Contudo, características reprodutivas e antropométricas maternas associadas a perfis de OLH, vêm sendo descritas na literatura. Além disso, os OLH podem estar associados ao DI e seus diferentes domínios. Nesta tese investigou-se a variação da composição de OLH no período pós-parto, com 2-8, 28-50 e 88-119 dias, a associação das características scoiodemograficas e antropométricas maternas com o perfil de OLH e a associação deles com o DI.

Os resultados apresentados nesta tese confirmam a hipótese de que os OLH variam de acordo com o tempo após o parto, com menores concentrações (em g/L) encontradas nos tempos mais tardios (88-119 dias). No entanto observou-se maiores concentrações em mmol/L aos 88-119 dias pós-parto. Essa diferença pode ser explicada pois os OLH com baixo peso molecular apresentam maiores concentrações em tempos mais tardios, o que incidiu na concentração em mmol/L, mas resultou em efeito inverso para a concentração em g/L.

A paridade materna foi positivamente correlacionada às concentrações de alguns OLH individuais, em sua maioria fucosilados aos 2-8 dias pós-parto. Mulheres com diferentes paridades não apresentaram similaridade no principal OLH de maior contribuição do perfil. Aquelas primíparas ou que estavam no segundo filho apresentaram o 2'FL como principal contribuinte do perfil. Foram observadas correlações negativas entre o IMC pré-gestacional e LNFP III e DFLNH com 2-8 dias pós-parto, e FLNH com 28-50 dias e DFLac com 88-119 dias e do ganho de peso gestacional até o terceiro trimestre com o DSLNT com 28-50 dias. Mulheres eutróficas ou com baixo peso apresentaram diferentes OLH de maior contribuição (principal OLH = LSTc) quando comparadas com aquelas com excesso de peso (principal OLH = 2'FL).

Foram encontradas também associações inversas (treze) diretas (seis) entre diferentes OLH e domínios de desenvolvimento infantil com os modelos cox multivariados. Na análise de subgrupo com mulheres secretoras a maioria das associações inversas permaneceram (doze) e outras novas (nove) foram observadas. Quanto as associações diretas, três também permaneceram e uma nova foi encontrada. De acordo com Fine & Gray, os modelos de riscos competitivos, entre as mulheres secretoras, um aumento de unidade de 3FL e LNH está associado a 5% de redução no risco de a criança estar na zona de monitoramento para comunicação. Além disso, um aumento em FLNH e DSLNT estão associados, respectivamente, com 12% e 25% de redução no risco de estar na zona de monitoramento no domínio de

coordenação motora fina, e um aumento em LNT e no índice de α -diversidade de Shannon, estão associados, respectivamente, com 10% e 21% de redução no risco de estar na zona de monitoramento para ≥ 2 domínios. Dessa forma, maiores concentrações de OLH fucosilados e sialilados, assim como a maior α -diversidade, protegeram a criança de estar na zona de monitoramento em seu primeiro ano de vida, mesmo quando estar na zona de monitoramento para cada domínio de desenvolvimento infantil foi considerado como um evento competitivo.

Observou-se que além dos determinantes genéticos o tempo após o parto e as características maternas, incluindo as modificáveis, foram associadas a composição de OLH, redimensionando a relevância e implicações clínicas da saúde e estilo de vida materna na composição do LH. É necessário considerar que os OLH, a partir dos presentes achados podem contribuir para o melhor desenvolvimento infantil. Sabe-se que outros fatores relacionados a composição do LH, como os ácidos graxos, são relacionados com melhor desenvolvimento neuropsicomotor. Além disso, aspectos não nutricionais também podem contribuir para esse efeito positivo, como o vínculo mãe e filho, bem como, o estímulo promovido pela mãe. Ainda assim, os achados da presente tese, somam-se às evidências dos efeitos positivos do AME para o DI, principalmente considerando que o período periparto é o período de maiores concentrações de OLH.

No Brasil, o acompanhamento pré-natal realizado pela atenção básica deve incluir o acompanhamento do ganho de peso, a partir do IMC pré-gestacional. Dessa forma, é imprescindível que sejam feitas orientações quanto ao ganho de peso adequado, à medida que o IMC pré-gestacional e o ganho de peso podem estar associados à saúde materna, e que está correlacionada a composição de OLH.

Na literatura há evidências consolidadas de que o AM exerce efeitos positivos na cognição infantil e esses efeitos podem ser observados a longo prazo, com impactos no desenvolvimento escolar e, posteriormente no nível de escolaridade na vida adulta. Os resultados do presente estudo sugerem que os OLH contribuem para esse efeito que promovem o DI dentro do esperado. Dessa forma, as orientações para a promoção do AME até os seis meses e complementado até pelo menos dois anos de vida da criança, devem ser estimuladas.

Fatores adicionais não descritos no presente estudo podem exercer influência na associação a composição dos OLH e o DI. Desta forma, novos estudos longitudinais com maior tamanho amostral, padronização adequada para coleta de LH, e controle de outras variáveis como estímulo materno e de cuidadores, devem ser incentivados.

9 REFERÊNCIAS

AAKKO, J.; KUMAR, H.; RAUTAVA, S.; WISE, A. *et al.* Human milk oligosaccharide categories define the microbiota composition in human colostrum. **Beneficial Microbes**, 8, n. 4, p. 563-567, 2017.

AE, S.; AK, K.; M, K.; E, S. *et al.* - Association of Maternal Probiotic Supplementation With Human Milk Oligosaccharide. **JAMA Pediatr**, 173, n. 3, p. 286-288, 2019.

ALDERETE, T. L.; AUTRAN, C.; BREKKE, B. E.; KNIGHT, R. *et al.* Associations between human milk oligosaccharides and infant body composition in the first 6 mo of life. **Am J Clin Nutr**, 102, n. 6, p. 1381-1388, Dec 2015.

ANDREAS, N.; KAMPMANN, B.; MEHRING LE-DOARE, K. - Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early Hum Dev**, 91, n. 11, p. 629-635, 2015.

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

AUSTIN, P. C.; FINE, J. P. Practical recommendations for reporting Fine-Gray model analyses for competing risk. **Stat Med**; v. 36, n. 27, p. 4391-400. 2017.

AUSTIN, S.; DE CASTRO, C. A.; SPRENGER, N.; BINIA, A. *et al.* Human Milk Oligosaccharides in the Milk of Mothers Delivering Term versus Preterm Infants. **Nutrients**, 11, n. 6, Jun 5 2019.

AZAD, M. B.; ROBERTSON, B.; ATAKORA, F.; BECKER, A. B. *et al.* Human Milk Oligosaccharide Concentrations Are Associated with Multiple Fixed and Modifiable Maternal Characteristics, Environmental Factors, and Feeding Practices. **J Nutr**, 148, n. 11, p. 1733-1742, Nov 1 2018.

BAJAJ, H.; YE, C.; HANLEY, A.; CONNELLY, P. *et al.* - Prior lactation reduces future diabetic risk through sustained postweaning. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 312, n. 3, p. E215-E223, 2017.

BALLARD, O.; MORROW, A. - Human milk composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatr Clin North Am**, 60, n. 1, p. 49-74, 2013.

BARROS, C. **Pontos de psicologia de desenvolvimento.**, Ática; , 1986.

BATISTA, D.; CHIARA, V.; GUGELMIN, S.; MARTINS, P. Atividade física e gestação: saúde da gestante não atleta e crescimento fetal. **Rev Bras Saúde Matern Infant.**, v.2, p. 151-158.

BAZANELLA, M.; MAIER, T. V.; CLAVEL, T.; LAGKOUVARDOS, I. *et al.* Randomized controlled trial on the impact of early-life intervention with bifidobacteria on the healthy infant fecal microbiota and metabolome. **Am J Clin Nutr**, 106, n. 5, p. 1274-1286, Nov 2017.

BERNARD, J. Y.; ARMAND, M.; PEYRE, H.; GARCIA, C. *et al.* Breastfeeding, Polyunsaturated Fatty Acid Levels in Colostrum and Child Intelligence Quotient at Age 5-6 Years. **J Pediatr**, 183, p. 43-50.e43, Apr 2017.

BIBBINS-DOMINGO, K.; GROSSMAN, D.; CURRY, S.; DAVIDSON, K. *et al.* Primary Care Interventions to Support Breastfeeding: US Preventive Services Task. **Jama**, 316, n. 16, p. 1688-1693, 2016.

BIKS, G. A.; BERHANE, Y.; WORKU, A.; GETE, Y. K. Exclusive breast feeding is the strongest predictor of infant survival in Northwest Ethiopia: a longitudinal study. **J Health Popul Nutr**, 34, p. 9, May 2015.

BOCCOLINI, C. S.; BOCCOLINI, P. M. M.; MONTEIRO, F. R.; VENÂNCIO, S. I. *et al.* Breastfeeding indicators trends in Brazil for three decades. **Rev Saude Publica**, 51, p. 108, 2017.

BODE, L. Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. **J Nutr**, 136, n. 8, p. 2127-2130, Aug 2006.

BODE, L. - Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. **Glycobiology**, 22, n. 9, p. 1147-1162, 2012.

BODE, L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. **Glycobiology**. 22: 1147-1162 p. 2012.

BODE, L. Human Milk Oligosaccharides: Next-Generation Functions and Questions. **Nestle Nutr Inst Workshop Ser**, 90, p. 191-201, 2019.

BODE, L.; JANTSCHER-KRENN, E. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. **Adv Nutr**, 3, n. 3, p. 383S-391S, May 2012.

BODE, L.; KUNZ, C.; MUHLY-REINHOLZ, M.; MAYER, K. *et al.* Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides. **Thromb Haemost**, 92, n. 6, p. 1402-1410, Dec 2004.

BOREWICZ, K.; GU, F.; SACCENTI, E.; ARTS, I. C. W. *et al.* Correlating Infant Faecal Microbiota Composition and Human Milk Oligosaccharide Consumption by Microbiota of One-Month Old Breastfed Infants. **Mol Nutr Food Res**, p. e1801214, Apr 24 2019.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa 2007. 978-85-88233-28-7. Disponível em: <http://www.ibfan.org.br/documentos/outras/doc-285.pdf>.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno – PNIAM**. Brasília: Ministério da Saúde, 1991.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Saúde da criança: acompanhamento do crescimento e desenvolvimento infantil** Brasilia: Ministério da Saúde, 2002. 85-334-0509-X 100 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. **II Pesquisa de Prevalência de Aleitamento Materno nas Capitais Brasileiras e Distrito Federal**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2009a. 108 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Iniciativa hospital amigo da criança: revista, atualizada e ampliada para o cuidado integrado. **Módulo 3: promovendo e incentivando a amamentação em um Hospital Amigo da Criança: curso de 20 horas para equipes de maternidade**, p. Editora do Ministério da Saúde, Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/iniciativa_hospital_amigo_criancas_modulo3.pdf.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Saúde da criança: Nutrição Infantil Aleitamento Materno e Alimentação Complementar**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2009. 9788533415614 112 p. Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_criancas_nutricao_aleitamento_alimentacao.pdf.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância**

Alimentar e Nutricional. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2011. 978-85-334-1813-4. Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/orientacoes_coleta_analise_dados_antropometricos.pdf.

BRASIL, Ministério da Saúde. Cadernos de Antenção Básica. Atenção ao Pré-natal de Baixo Risco. Brasilia: Editora do Ministério da Saúde, 2013. 978-85-334-2043-4. Disponível em: http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/publicacoes/caderno_32.pdf.

BRASIL, Ministério da Saúde. Atenção à Saúde do Recém-Nascido Guia para os Profissionais de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 9788533419827. 195 p. Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/atencao_saude_recem_nascido_v1.pdf.

BRASIL, Ministério da Saúde. 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. Bases para a discussão da Política Nacional de Promoção, Proteção e Apoio ao Aleitamento Materno. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 978-85-334-2531-6 68 p. Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/bases_discussao_politica_aleitamento_materno.pdf

BRASIL, Ministério da Saúde; IBGE, Intituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cooperação Técnica de Pesquisa em Saúde de Base Nacional Domiciliar para coletar informações importantes sobre a saúde da população e a capacidade do Sistema Único de Saúde (SUS), com foco na Atenção Primária em Saúde. 2019. Disponível em:
<http://saude.gov.br/noticias/agencia-saude/46130-ministerio-tera-retrato-da-saude-da-populacao-2>

CAO, X.; SONG, D.; YANG, M.; YANG, N. et al. - Comparative Analysis of Whey N-Glycoproteins in Human Colostrum and Mature Milk. **J Agric Food Chem**, 65, n. 47, p. 10360-10367, 2017.

CERDÓ, T.; DIÉGUEZ, E.; CAMPOY, C. Infant growth, neurodevelopment and gut microbiota during infancy: which nutrients are crucial? **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 22, n. 6, p. 434-441, Nov 2019.

CHARBONNEAU, M. R.; O'DONNELL, D.; BLANTON, L. V.; TOTTEN, S. M. et al. Sialylated Milk Oligosaccharides Promote Microbiota-Dependent Growth in Models of Infant Undernutrition. **Cell**, 164, n. 5, p. 859-871, Feb 2016.

COLLADO, M. C.; CERNADA, M.; BAÜERL, C.; VENTO, M. *et al.* Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. **Gut Microbes**, 3, n. 4, p. 352-365, 2012 Jul-Aug 2012.

COMMITTEE ON OBSTETRIC PRACTICE, T. A. I. O. U. I. M., AND THE SOCIETY FOR MATERNAL-FETAL MEDICINE. Committee Opinion No 700: Methods for Estimating the Due Date. **Obstet Gynecol**, 129, n. 5, p. e150-e154, 05 2017.

CORDIER, S.; BOUQUET, E.; WAREMBOURG, C.; MASSART, C. *et al.* Perinatal exposure to chlordcone, thyroid hormone status and neurodevelopment in infants: the Timoun cohort study in Guadeloupe (French West Indies). **Environ Res**, 138, p. 271-278, Apr 2015.

CRUME, T. L.; OGDEN, L. G.; MAYER-DAVIS, E. J.; HAMMAN, R. F. *et al.* The impact of neonatal breast-feeding on growth trajectories of youth exposed and unexposed to diabetes in utero: the EPOCH Study. **Int J Obes (Lond)**, 36, n. 4, p. 529-534, Apr 2012.

CRUZ, L.; SILVA, J.; LEMOS, E. Desenvolvimento cognitivo da criança: influência dos fatores ambientais. **IX Colóquio Do Museu Pedagógico**, v.1, p. 997-1010.

CT, P.; HTTPS://ORCID.ORG, I.-O.; MW, L.; MV, L. *et al.* - Breastmilk Lipids and Oligosaccharides Influence Branched Short Chain Fatty Acid. **Mol Nutr Food Res**, 4, n. 10, p. 201900977, 2019.

DAVE, J.; WILCOX, M. H.; KELLETT, M. Glove powder: implications for infection control. **J Hosp Infect**, 42, n. 4, p. 283-285, Aug 1999.

DAVIS, J. C.; LEWIS, Z. T.; KRISHNAN, S.; BERNSTEIN, R. M. *et al.* Growth and Morbidity of Gambian Infants are Influenced by Maternal Milk Oligosaccharides and Infant Gut Microbiota. **Sci Rep**, 7, p. 40466, Jan 2017.

DE JAGER, E.; BROADBENT, J.; FULLER-TYSZKIEWICZ, M.; SKOUTERIS, H. The role of psychosocial factors in exclusive breastfeeding to six months postpartum. **Midwifery**, 30, n. 6, p. 657-666, Jun 2014.

DE LUCA, A.; FRASQUET-DARRIEUX, M.; GAUD, M.; CHRISTIN, P. *et al.* - Higher Leptin but Not Human Milk Macronutrient Concentration Distinguishes. **PLoS One**, 11, n. 12, p. 0168568, 2016.

- DEMESTRE, X.; SCHONHAUT, L.; MORILLAS, J.; MARTÍNEZ-NADAL, S. *et al.* [Development deficit risks in the late premature newborn: Evaluation at 48 months using the Ages & Stages Questionnaires®]. **An Pediatr (Barc)**, 84, n. 1, p. 39-45, Jan 2016.
- DIMITRAKI, M.; TSIKOURAS, P.; MANAV, B.; GIOKA, T. *et al.* Evaluation of the effect of natural and emotional stress of labor on lactation and breast-feeding. **Arch Gynecol Obstet**, 293, n. 2, p. 317-328, Feb 2016.
- DORNELAS, L. E. F.; DUARTE, N. M.; MAGALHÃES, L. E. C. [Neuropsychomotor developmental delay: conceptual map, term definitions, uses and limitations]. **Rev Paul Pediatr**; v. 33 n. 1, p. 88-103. doi: 10.1016/j.rpped.2014.04.009. 2015.
- DORNELAS, L. F.; MAGALHAES, L. C. Functional performance of school children diagnosed with developmental delay up. **Rev Paul Pediatr**, 34, n. 1, p. 78-85, 2016.
- DUBOIS, L.; GIRARD, M. Social inequalities in infant feeding during the first year of life. The Longitudinal Study of Child Development in Québec (LSCDQ 1998-2002). **Public Health Nutr**, 6, n. 8, p. 773-783, Dec 2003.
- DUNN, S.; DAVIES, B.; MCCLEARY, L.; EDWARDS, N. *et al.* The relationship between vulnerability factors and breastfeeding outcome. **J Obstet Gynecol Neonatal Nurs**, 35, n. 1, p. 87-97, 2006 Jan-Feb 2006.
- DYBALL, R. E.; LENG, G. Regulation of the milk ejection reflex in the rat. **J Physiol**, 380, p. 239-256, Nov 1986.
- EICKMANN, S. H.; EMOND, A. M.; LIMA, M. Evaluation of child development: beyond the neuromotor aspect. **J Pediatr (Rio J)**, 92, n. 3 Suppl 1, p. S71-83, 2016 May-Jun 2016.
- ENGFER, M.; STAHL, B.; FINKE, B.; SAWATZKI, G. *et al.* - Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper. **Am J Clin Nutr**, 71, n. 6, p. 1589-1596, 2000.
- ERICK, M. Breast milk is conditionally perfect. **Med Hypotheses**, 111, p. 82-89, Feb 2018.

FELTNER, C.; WEBER, R. P.; STUEBE, A.; GRODENSKY, C. A. *et al.* Breastfeeding Programs and Policies, Breastfeeding Uptake, and Maternal Health Outcomes in Developed Countries. In, 2018.

FERNALD, L. C. H.; PRADO, E. L.; KARIGER, P. K.; RAIKES, A. **A toolkit for measuring early childhood development in low and middle income countries.** Washington, D.C.: World Bank Group, 2017. Disponível em: <https://www.worldbank.org/en/programs/sief-trust-fund/publication/a-toolkit-for-measuring-early-child-development-in-low-and-middle-income-countries>.

FILGUEIRAS, A.; PIRES, P.; MAISONETTE, S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Psychometric properties of the Brazilian-adapted version of the Ages and Stages Questionnaire in public child daycare centers. **Early Hum Dev**, 89, n. 8, p. 561-576, Aug 2013.

FINE, J. P.; GRAY, R. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. **J Am Stat Assoc**; n.94, p. 496-509. 1999.

FIOCRUZ, F. O. C. “Nascer no Brasil: Inquérito Nacional sobre Parto e Nascimento” Questionário Hospitalar – Puérpera. 2011.

FORBES, C. E.; GRAFMAN, J. The role of the human prefrontal cortex in social cognition and moral judgment. **Annu Rev Neurosci**, 33, p. 299-324, 2010.

FREEMAN, M. E.; KANYICKA, B.; LERANT, A.; NAGY, G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. **Physiol Rev**, 80, n. 4, p. 1523-1631, Oct 2000.

GABRIELLI, O.; ZAMPINI, L.; GALEAZZI, T.; PADELLA, L. *et al.* Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. **Pediatrics**, 128, n. 6, p. e1520-1531, Dec 2011.

GARIBOTTI, G.; COMAR, H.; VASCONI, C.; GIANNINI, G. *et al.* Child psychomotor development and its relationship with socio-demographic and family stimulation factors in children from Bariloche, Argentina. **Arch Argent Pediatr**, 111, n. 5, p. 384-390, Oct 2013.

GILA-DIAZ, A.; ARRIBAS, S. M.; ALGARA, A.; MARTÍN-CABREJAS, M. A. *et al.* A Review of Bioactive Factors in Human Breastmilk: A Focus on Prematurity. **Nutrients**, 11, n. 6, Jun 2019.

GIUFFRIDA, F.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; BERTSCHY, E.; FONTANNAZ, P. *et al.* Temporal Changes of Human Breast Milk Lipids of Chinese Mothers. **Nutrients**, 8, n. 11, Nov 2016.

GOEHRING, K.; KENNEDY, A.; PRIETO, P.; BUCK, R. Direct evidence for the presence of human milk oligosaccharides in the circulation of breastfed infants. **PLoS One**, 9, n. 7, p. e101692, 2014.

GOEHRING, K. C.; KENNEDY, A. D.; PRIETO, P. A.; BUCK, R. H. Direct evidence for the presence of human milk oligosaccharides in the circulation of breastfed infants. **PLoS One**, 9, n. 7, p. e101692, 2014.

HALLAL, C.; MARQUES, N.; BRACCIALLI, L. Aquisição de habilidades funcionais na área de mobilidade em crianças atendidas em um programa de estimulação precoce. **Revista brasileira de crescimento e desenvolvimento humano**, v.1., p. 27-34.

HALPERN, R.; FIGUEIRAS, A. Influências ambientais na saúde mental da criança. **Jornal de Pediatria**, v.2 Supl, p. S104-S110.

HARVILLE, E. W.; RABITO, F. A. Housing conditions and birth outcomes: The National Child Development Study. **Environ Res**, 161, p. 153-157, Feb 2018.

HASHEMI, R.; COMMENGES, D. Correction of the p-value after multiple tests in a Cox proportional hazard model. **Lifetime Data Anal**; v. 8, n. 4, p. 335-48. doi: 10.1023/a:1020514804325. 2002.

HORTA, B. L.; LORET DE MOLA, C.; VICTORA, C. G. Breastfeeding and intelligence: a systematic review and meta-analysis. **Acta Paediatr**, 104, n. 467, p. 14-19, Dec 2015.

HORWOOD, L. J.; FERGUSSON, D. M. Breastfeeding and later cognitive and academic outcomes. **Pediatrics**, 101, n. 1, p. E9, Jan 1998.

HUNEGNAW, M. T.; GEZIE, L. D.; TEFERRA, A. S. Exclusive breastfeeding and associated factors among mothers in Gozamin district, northwest Ethiopia: a community based cross-sectional study. **Int Breastfeed J**, 12, p. 30, 2017.

INTERGROWTH-21ST, A. G. ANTHROPOMETRY HANDBOOK. The International Fetal and Newborn Growth Consortium. 2012.

IOM, I. O. M.; NRC, N. R. C. **Transforming the Workforce for Children Birth Through Age 8 : A Unifying Foundation** . Washington: DC: The National Academies Press, 2015. DOI <https://doi.org/10.17226/19401>.

JANTSCHER-KRENN, E.; ZHEREBTSOV, M.; NISSAN, C.; GOTH, K. *et al.* The human milk oligosaccharide disialyllacto-N-tetraose prevents necrotising enterocolitis in neonatal rats. **Gut**, 61, n. 10, p. 1417-1425, Oct 2012.

JOHNSON, L.; LLEWELLYN, C. H.; VAN JAARSVELD, C. H.; COLE, T. J. *et al.* Genetic and environmental influences on infant growth: prospective analysis of the Gemini twin birth cohort. **PLoS One**, 6, n. 5, p. e19918, 2011.

JOHNSON, P. H.; WATKINS, W. M. Purification of the Lewis blood-group gene associated alpha-3/4-fucosyltransferase from human milk: an enzyme transferring fucose primarily to type 1 and lactose-based oligosaccharide chains. **Glycoconj J**, 9, n. 5, p. 241-249, Oct 1992.

JORGENSEN, J. M.; ARNOLD, C.; ASHORN, P.; ASHORN, U. *et al.* Lipid-Based Nutrient Supplements During Pregnancy and Lactation Did Not Affect Human Milk Oligosaccharides and Bioactive Proteins in a Randomized Trial. **J Nutr**, Aug 2017.

KAC, G.; BENÍCIO, M. H.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G.; VALENTE, J. G. *et al.* Breastfeeding and postpartum weight retention in a cohort of Brazilian women. **Am J Clin Nutr**, 79, n. 3, p. 487-493, Mar 2004.

KOBATA, A. Structures and application of oligosaccharides in human milk. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**, 86, n. 7, p. 731-747, 2010.

KON, I. Y.; SHILINA, N. M.; GMOSHINSKAYA, M. V.; IVANUSHKINA, T. A. The study of breast milk IGF-1, leptin, ghrelin and adiponectin levels as possible reasons of high weight gain in breast-fed infants. **Ann Nutr Metab**, 65, n. 4, p. 317-323, 2014.

KUCHENBECKER, J.; JORDAN, I.; REINBOTT, A.; HERRMANN, J. *et al.* Exclusive breastfeeding and its effect on growth of Malawian infants: results from a cross-sectional study. **Paediatr Int Child Health**, 35, n. 1, p. 14-23, Feb 2015.

KUMAZAKI, T.; YOSHIDA, A. Biochemical evidence that secretor gene, Se, is a structural gene encoding a specific fucosyltransferase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 81, n. 13, p. 4193-4197, Jul 1984.

KUNZ, C.; RODRIGUEZ-PALMERO, M.; KOLETZKO, B.; JENSEN, R. - Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects. **Clin Perinatol**, 26, n. 2, p. 307-333, 1999.

KUNZ, C.; RODRIGUEZ-PALMERO, M.; KOLETZKO, B.; JENSEN, R. Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins, and carbohydrates. **Clin Perinatol**, 26, n. 2, p. 307-333, Jun 1999.

KUNZ, C.; RUDLOFF, S.; BAIER, W.; KLEIN, N. *et al.* Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. **Annu Rev Nutr**, 20, p. 699-722, 2000.

LARSSON, M. W.; LIND, M. V.; LARNKJÆR, A.; DUE, A. P. *et al.* Excessive Weight Gain Followed by Catch-Down in Exclusively Breastfed Infants: An Exploratory Study. **Nutrients**, 10, n. 9, Sep 2018.

LARSSON, M. W.; LIND, M. V.; LAURSEN, R. P.; YONEMITSU, C. *et al.* Human Milk Oligosaccharide Composition Is Associated With Excessive Weight Gain During Exclusive Breastfeeding-An Explorative Study. **Front Pediatr**, 7, p. 297, 2019.

LAWRENCE, P. B. Breast milk. Best source of nutrition for term and preterm infants. **Pediatr Clin North Am**, 41, n. 5, p. 925-941, Oct 1994.

LEE, S.; LEE, D. K. What is the proper way to apply the multiple comparison test? **Korean J Anesthesiol**; v. 71, n. 5, p. 353-60. doi: 10.4097/kja.d.18.00242. 2018.

LOHMAN, T. G.; ROCHE, A. F.; MARTORELL, R. **Anthropometric standardization reference manual**. . Champaign, IL: Human Kinetics Books, 1988. v. vi). 0873221214. .

MAESSEN, S.; DERRAIK, J.; BINIA, A.; CUTFIELD, W. - Perspective: Human Milk Oligosaccharides: Fuel for Childhood Obesity Prevention? **Adv Nutr**, 5, n. 5561598, 2019.

MAGNUSSON, D.; CAIRNS, R. B. Developmental science: Toward a unified framework. . In: CAIRNS, R. B.;ELDER, G. H., *et al* (Ed.). **Developmental science**. New York: Cambridge University Press, 1996.

MAIA, P. R. da S.; NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G.; SILVA, D. A. Bases conceituais para uma estratégia de gestão: o caso da Rede Nacional de Bancos de Leite Humano. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro , v. 20, n. 6, p. 1700-1708, 2004.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLoS One**; v. 8, n. 4, p. e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217. 2013.

MCGUIRE, M. K.; MEEHAN, C. L.; MCGUIRE, M. A.; WILLIAMS, J. E. *et al.* What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in milk produced by healthy women vary geographically. **Am J Clin Nutr**, 105, n. 5, p. 1086-1100, May 2017.

MCJARROW, P.; RADWAN, H.; MA, L.; MACGIBBON, A. *et al.* Human Milk Oligosaccharide, Phospholipid, and Ganglioside Concentrations in Breast Milk from United Arab Emirates Mothers: Results from the MISC Cohort. **Nutrients**, 11, n. 10, 2019.

MAJNEMER, A.; SHEVELL, M. I. Diagnostic yield of the neurologic assessment of the developmentally delayed child. **J Pediatr**; v.127, n. 2, p.193-9. 1995. doi: 10.1016/s0022-3476(95)70294-6.

MIRALLES, O.; SÁNCHEZ, J.; PALOU, A.; PICÓ, C. A physiological role of breast milk leptin in body weight control in developing infants. **Obesity (Silver Spring)**, 14, n. 8, p. 1371-1377, Aug 2006.

MOUKARZEL, S.; BODE, L. - Human Milk Oligosaccharides and the Preterm Infant: A Journey in Sickness and in. **Clin Perinatol**, 44, n. 1, p. 193-207, 2017.

MUNBLIT, D.; TRENEVA, M.; PERONI, D.; COLICINO, S. *et al.* - Colostrum and Mature Human Milk of Women from London, Moscow, and Verona. **Nutrients**, 8, n. 11, 2016.

MÄKELÄ, J.; LINDBORG, K.; NIINIKOSKI, H.; YANG, B. *et al.* Breast milk fatty acid composition differs between overweight and normal weight women: the STEPS Study. **Eur J Nutr**, 52, n. 2, p. 727-735, Mar 2013.

NASCIMENTO, S.; GODOY, A.; SURITA, F.; PINTO E SILVA, J. Recomendações para a prática de exercício físico na gravidez: uma revisão crítica da literatura. . **Rev bras ginecol obstet.**, v.36, p. 423-431.

NEWBURG, D. S. Innate immunity and human milk. **J Nutr**, 135, n. 5, p. 1308-1312, May 2005.

NEWTON, R. W.; WRAITH, J. E. Investigation of developmental delay. **Arch Dis Child**, 72, n. 5, p. 460-465, May 1995.

NOLAN, L. S.; PARKS, O. B.; GOOD, M. A Review of the Immunomodulating Components of Maternal Breast Milk and Protection Against Necrotizing Enterocolitis. **Nutrients**, 12, n. 1, Dec 2019.

ODDY, W. H.; KENDALL, G. E.; LI, J.; JACOBY, P. *et al.* The long-term effects of breastfeeding on child and adolescent mental health: a pregnancy cohort study followed for 14 years. **J Pediatr**, 156, n. 4, p. 568-574, Apr 2010.

OLIVEROS, E.; RAMIREZ, M.; VAZQUEZ, E.; BARRANCO, A. *et al.* Oral supplementation of 2'-fucosyllactose during lactation improves memory and learning in rats. **J Nutr Biochem**, 31, p. 20-27, 05 2016.

PALMEIRA, P.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. Immunology of breast milk. **Rev Assoc Med Bras (1992)**, 62, n. 6, p. 584-593, Sep 2016.

PARK, H. K.; AHIMA, R. S. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. **Metabolism**, 64, n. 1, p. 24-34, Jan 2015.

PATNODE, C.; HENNINGER, M.; SENGER, C.; PERDUE, L. *et al.* Primary Care Interventions to Support Breastfeeding: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. **Jama**, 316, n. 16, p. 1694-1705, 2016.

PEREIRA, P. F.; ALFENAS RDE, C.; ARAUJO, R. M. Does breastfeeding influence the risk of developing diabetes mellitus in children? A review of current evidence. **J Pediatr (Rio J)**, 90, n. 1, p. 7-15, Jan-Feb 2014.

PEREIRA, V.; CHIODELLI, T.; RODRIGUES, O.; OLIVEIRA E SILVA, C. *et al.* Desenvolvimento do bebê nos dois primeiros meses de vida: variáveis maternas e sociodemográficas. **Pensando familias.**, v.1 p. 64-77.

POYTHRESS, J. C.; LEE, M. Y.; YOUNG, J. Planning and analyzing clinical trials with competing risks: Recommendations for choosing appropriate statistical methodology. **Pharm Stat;** v. 19, n. 1, p. 4-21. doi: 10.1002/pst.1966. 2020.

QIAO, Y.; FENG, J.; YANG, J.; GU, G. The relationship between dietary vitamin A intake and the levels of sialic acid in the breast milk of lactating women. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, 59, n. 4, p. 347-351, 2013.

RIDDLE, O.; BATES, R.; DYKSHORN, S. The preparation, identification and assay of prolactin a hormone of anterior pituitary. . **American Journal of Physiology**, p. 191–216, Disponível em: <http://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajplegacy.1933.105.1.191>.

ROWNTREE, D. **Statistics Without Tears: A Primer for Non-Mathematicians.** New York: Charles Scribner's Sons, 1981.

RUHAAK, L.; STROBLE, C.; UNDERWOOD, M.; LEBRILLA, C. - Detection of milk oligosaccharides in plasma of infants. **Anal Bioanal Chem**, 406, n. 24, p. 5775-5784, 2014.

RUIZ, L.; ESPINOSA-MARTOS, I.; GARCÍA-CARRAL, C.; MANZANO, S. *et al.* What's Normal? Immune Profiling of Human Milk from Healthy Women Living in Different Geographical and Socioeconomic Settings. **Front Immunol**, 8, p. 696, 2017.

SANTANA, C. M.; FILGUEIRAS, A.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Ages & Stages Questionnaire-Brazil-2011: Adjustments on an Early Childhood Development Screening Measure. **Glob Pediatr Health**, 2, p. 2333794X15610038, 2015.

SCHANLER, R. J.; HURST, N. M.; LAU, C. The use of human milk and breastfeeding in premature infants. **Clin Perinatol**, 26, n. 2, p. 379-398, vii, Jun 1999.

SHARMA, A. Efficacy of early skin-to-skin contact on the rate of exclusive breastfeeding in term neonates: a randomized controlled trial. **Afr Health Sci**, 16, n. 3, p. 790-797, 2016.

SHEVELL, M.; ASHWAL, S.; DONLEY, D.; FLINT, J.; GINGOLD, M.; HIRTZ, D., et al. Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. **Neurology**; v. 60, n. 3, p. 367-80. doi: 10.1212/01.wnl.0000031431.81555.16. 2003.

SILVA, M. A. D.; MENDONÇA FILHO, E. J. D.; MÔNEGO, B. G.; BANDEIRA, D. R. Instruments for multidimensional assessment of child development: a systematic review. **Early Child Development and Care.**

SJ, T. B.; IM, B.-O.; AL, F.; E, V. H. *et al.* - Functional role and mechanisms of sialyllactose and other sialylated milk. **Nutr Rev**, 72, n. 6, p. 377-389, 2014.

SMILOWITZ, J. T.; LEBRILLA, C. B.; MILLS, D. A.; GERMAN, J. B. *et al.* Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate. **Annu Rev Nutr**, 34, p. 143-169, 2014.

SOUZA, S. N. D. H. D.; MIGOTO, M. T.; ROSSETTO, E.; GIOVANINI *et al.* Prevalence of breastfeeding and associated factors in the municipality of Londrina (PR, Brazil). **Acta Paul Enferm**, v.1 p. 29-35 Disponível em: [ttp://www.scielo.br/pdf/ape/v25n1/en_v25n1a06.pdf](http://www.scielo.br/pdf/ape/v25n1/en_v25n1a06.pdf).

SPRANGER, M.; LINDHOLM, D.; BANDTLOW, C.; HEUMANN, R. *et al.* Regulation of Nerve Growth Factor (NGF) Synthesis in the Rat Central Nervous System: Comparison between the Effects of Interleukin-1 and Various Growth Factors in Astrocyte Cultures and in vivo. **Eur J Neurosci**, 2, n. 1, p. 69-76, Jan 1990.

SPRENGER, N.; LEE, L.; DE CASTRO, C.; STEENHOUT, P. *et al.* - Longitudinal change of selected human milk oligosaccharides and association to. **PLoS One**, 12, n. 2, p. 0171814, 2017.

SPRENGER, N.; LEE, L. Y.; DE CASTRO, C. A.; STEENHOUT, P. *et al.* Longitudinal change of selected human milk oligosaccharides and association to infants' growth, an observatory, single center, longitudinal cohort study. **PLoS One**, 12, n. 2, p. e0171814, 2017.

SPYRIDES, M. H.; STRUCHINER, C. J.; BARBOSA, M. T.; KAC, G. Effect of predominant breastfeeding duration on infant growth: a prospective study using nonlinear mixed effect models. **J Pediatr (Rio J)**, 84, n. 3, p. 237-243, 2008 May-Jun 2008.

SQUIRES, J.; TWOMBLY, E.; BRICKER, D.; POTTER, L. **ASQ-3™ User's Guide**. 2009a. 9781598570045.

SQUIRES, J.; TWOMBLY, E.; BRICKER, D.; POTTER, L. Excerpted from ASQ-3™ User's Guide. Brookes Publishing 2009b.

STANLEY, P.; CUMMINGS, R. Chapter 14: Structures Common to Different Glycans. In: VARKI, A.; CUMMINGS, R., *et al* (Ed.). **Source Essentials of Glycobiology**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017. cap. 13. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453042/>.

STEINBERG, L.; BOMSTEIN, M. H.; VAND ELL, D. **Lifespan development: Infancy through adulthood**. Mason, Ohio: Cengage Learning, 2010.

STUEBE, A. M.; SCHWARZ, E. B. The risks and benefits of infant feeding practices for women and their children. **J Perinatol**, 30, n. 3, p. 155-162, Mar 2010.

TAKEUCHI, A.; KOEDA, T.; TAKAYANAGI, T.; SATO, K. *et al*. Reading difficulty in school-aged very low birth weight infants in Japan. **Brain Dev**, 38, n. 9, p. 800-806, Oct 2016.

TEWABE, T. Timely initiation of breastfeeding and associated factors among mothers in Motta town, East Gojjam zone, Amhara regional state, Ethiopia, 2015: a cross-sectional study. **BMC Pregnancy Childbirth**, 16, n. 1, p. 314, 10 2016.

TEWABE, T.; MANDESH, A.; GUALU, T.; ALEM, G. *et al*. Exclusive breastfeeding practice and associated factors among mothers in Motta town, East Gojjam zone, Amhara Regional State, Ethiopia, 2015: a cross-sectional study. **Int Breastfeed J**, 12, p. 12, 2016.

TEXTOR, J.; HARDT, J.; KNÜPPEL, S. DAGitty: a graphical tool for analyzing causal diagrams. **Epidemiology**, 22, n. 5, p. 745, Sep 2011.

THERNEAU, T.; CROWSON, C.; ATKINSON, E. Using Time Dependent Covariates and Time Dependent Coefficients in the Cox Model. June 12, 2020.

THURL, S.; MUNZERT, M.; BOEHM, G.; MATTHEWS, C. *et al*. Systematic review of the concentrations of oligosaccharides in human milk. **Nutr Rev**, 75, n. 11, p. 920-933, Nov 2017.

TONON, K. M.; DE MORAIS, M. B.; ABRÃO, A. C. F. V.; MIRANDA, A. *et al*. Maternal and Infant Factors Associated with Human Milk Oligosaccharides Concentrations According to Secretor and Lewis Phenotypes. **Nutrients**, 11, n. 6, Jun 17 2019.

TRAM, T. H.; BRAND MILLER, J. C.; MCNEIL, Y.; MCVEAGH, P. Sialic acid content of infant saliva: comparison of breast fed with formula fed infants. **Arch Dis Child**, 77, n. 4, p. 315-318, Oct 1997.

UNDERWOOD, M. A.; DAVIS, J. C. C.; KALANETRA, K. M.; GEHLOT, S. *et al.* Digestion of Human Milk Oligosaccharides by *Bifidobacterium breve* in the Premature Infant. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, 65, n. 4, p. 449-455, Oct 2017.

UNDERWOOD, M. A.; GAERLAN, S.; DE LEOZ, M. L.; DIMAPASOC, L. *et al.* Human milk oligosaccharides in premature infants: absorption, excretion, and influence on the intestinal microbiota. **Pediatr Res**, 78, n. 6, p. 670-677, Dec 2015.

UNEP, U. N. E. P.; UNICEF, U. N. C. S. F.; WHO, W. H. O. Children in the New Millennium: Environmental Impact on Health. Republic of Malta: Library of Congress Cataloguing in Publication Data 2002.

URASHIMA, T.; HIRABAYASHI, J.; SATO, S.; KOBATA, A. Human Milk Oligosaccharides as Essential Tools for Basic and Application Studies on Galectins. **FCCA (Forum: Carbohydrates Coming of Age)**, DOI: doi: 10.4052/tigg.1734.1SE.

VAZQUEZ, E.; BARRANCO, A.; RAMIREZ, M.; GRUART, A. *et al.* Effects of a human milk oligosaccharide, 2'-fucosyllactose, on hippocampal long-term potentiation and learning capabilities in rodents. **J Nutr Biochem**, 26, n. 5, p. 455-465, May 2015.

VELOSO, F. C. S.; KASSAR, L. M. L.; OLIVEIRA, M. J. C.; LIMA, T. H. B. *et al.* Analysis of neonatal mortality risk factors in Brazil: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **J Pediatr (Rio J)**, 95, n. 5, p. 519-530, 2019 Sep - Oct 2019.

VENANCIO, S. I.; BORTOLI, M. C.; FRIAS, P. G.; GIUGLIANI, E. R. J. *et al.* Development and validation of an instrument for monitoring child development indicators. **J Pediatr (Rio J)**, Nov 2019.

VERDUCI, E.; BANDERALI, G.; BARBERI, S.; RADAELLI, G. *et al.* Epigenetic effects of human breast milk. **Nutrients**, 6, n. 4, p. 1711-1724, Apr 2014.

VICTORA, C. G.; BAHL, R.; BARROS, A. J.; FRANÇA, G. V. *et al.* Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. **Lancet**, 387, n. 10017, p. 475-490, Jan 2016.

WANG, B. Sialic Acid Is an Essential Nutrient for Brain Development and Cognition. **Annu Rev Nutr**, 29, p. 177-222, 2009a.

WANG, B. - Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. **Annu Rev Nutr**, 29, p. 177-222, 2009b.

WANG, B.; DOWNING, J. A.; PETOCZ, P.; BRAND-MILLER, J. *et al.* Metabolic fate of intravenously administered N-acetylneurameric acid-6-14C in newborn piglets. **Asia Pac J Clin Nutr**, 16, n. 1, p. 110-115, 2007.

WANG, B.; MCVEAGH, P.; PETOCZ, P.; BRAND-MILLER, J. - Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breastfed compared with. **Am J Clin Nutr**, 78, n. 5, p. 1024-1029, 2003.

WANG, B.; MCVEAGH, P.; PETOCZ, P.; BRAND-MILLER, J. Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breastfed compared with formula-fed infants. **Am J Clin Nutr**, 78, n. 5, p. 1024-1029, Nov 2003.

WANG, B.; MILLER, J. B.; SUN, Y.; AHMAD, Z. *et al.* A longitudinal study of salivary sialic acid in preterm infants: Comparison of human milk-fed versus formula-fed infants. **J Pediatr**, 138, n. 6, p. 914-916, Jun 2001.

WANG, B.; YU, B.; KARIM, M.; HU, H. *et al.* Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets. **Am J Clin Nutr**, 85, n. 2, p. 561-569, Feb 2007.

WANG, H. X.; CHEN, Y.; HAQUE, Z.; DE VEER, M. *et al.* Sialylated milk oligosaccharides alter neurotransmitters and brain metabolites in piglets: an. **Nutr Neurosci**, p. 1-11, Nov 2019.

WANG, M.; LI, M.; WU, S.; LEBRILLA, C. B. *et al.* Fecal microbiota composition of breast-fed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, 60, n. 6, p. 825-833, Jun 2015.

WHO, W. H. O. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneve: Who library cataloguing-in-publication data 1995.

WHO, W. H. O. **The optimal duration of exclusive breastfeeding report of an expert consultation.** . Geneva, Switzerland, WHO, 2001.

WHO, W. H. O. **WHO child growth standards : length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-forheight and body mass index-for-age : methods and developmen.** Switzerland: WHO Press, 2006.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **INDICATORS FOR ASSESSING INFANT AND YOUNG CHILD FEEDING PRACTICES.** Washington D.C., USA: Conclusions of a consensus meeting held 6-8 November 2007, 2007. Disponível em:
http://www.who.int/nutrition/publications/iycf_indicators_for_peer_review.pdf.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Infant and young child feeding : model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals.** Geneve: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2009. 9789241597494. Disponível em:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK148965/pdf/Bookshelf_NBK148965.pdf.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International statistical classification of diseases and related health problems. ICD-10 - 10th revision.** Switzerland: 2016. 978 92 4 154916 5.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **GUIDELINE: Protecting, promoting and supporting breastfeeding in facilities providing maternity and newborn services.** Geneve: WHO Document Production Service, 2017. 9789241550086. 136 p. Disponível em:
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259386/1/9789241550086-eng.pdf?ua=1>.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ten steps to successful breastfeeding** (revised 2018).

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION.; UNICEF, UNITED NATIONS INTERNATIONAL CHILDREN'S EMERGENCY FUND. **Protecting, promoting and supporting breast-feeding The special role of maternity services.** Geneve: Office Publication World of Health Organization, 1990. 9241561300. Disponível em:
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/39679/1/9241561300.pdf?ua=1&ua=1>.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION.; UNICEF, UNITED NATIONS INTERNATIONAL CHILDREN'S EMERGENCY FUND. **Baby-Friendly Hospital Initiative Revised, updated and expanded for integrated care.** 2009.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION.; UNICEF, UNITED NATIONS INTERNATIONAL CHILDREN'S EMERGENCY FUND. Tracking progress for breastfeeding policies and programmes: Global breastfeeding scorecard 2017. 2017.

WONG, P. D.; ANDERSON, L. N.; DAI, D. D. W.; PARKIN, P. C. *et al.* The Association of Breastfeeding Duration and Early Childhood Cardiometabolic Risk. **J Pediatr**, 192, p. 80-85.e81, Jan 2018.

WU, L.; RUHAAK, L.; LEBRILLA, C. - Analysis of Milk Oligosaccharides by Mass Spectrometry. **Methods Mol Biol**, p. 121-129, 2017.

WU, Y.; SHAO, Z.; GAO, W.; LI, H. *et al.* - [Relationship between the level of sialic acid during perinatal period and early. **Zhonghua Er Ke Za Zhi**, 52, n. 2, p. 107-111, 2014.

XIAO, L.; VAN DE WORP, W. R.; STASSEN, R.; VAN MAASTRIGT, C. *et al.* Human milk oligosaccharides promote immune tolerance via direct interactions with human dendritic cells. **Eur J Immunol**, Mar 22 2019.

XIAO, L.; VAN DE, W. W.; STASSEN, R.; VAN MAASTRIGT, C. *et al.* - Human milk oligosaccharides promote immune tolerance via direct interactions with. **Eur J Immunol**, 49, n. 7, p. 1001-1014, 2019.

XIAO, L.; VAN'T LAND, B.; VAN DE WORP, W. R. P. H.; STAHL, B. *et al.* Early-Life Nutritional Factors and Mucosal Immunity in the Development of Autoimmune Diabetes. **Front Immunol**, 8, p. 1219, 2017.

YILMAZ, H. L.; SAYGILI-YILMAZ, E. S.; GUNESACAR, R. Interleukin-10 and -12 in human milk at 3 stages of lactation: a longitudinal study. **Adv Ther**, 24, n. 3, p. 603-610, 2007 May-Jun 2007.

ZHU, Y.; LI, M. Effects of sialic acid in serum and breast milk on the growth and development of infants at different stages during pregnancy and lactation. **Int J Clin Exp Med**, v.10, p. 12322-12328.

ZHU, Y.; LI, M. Effects of sialic acid in serum and breast milk on the growth and development of infants at different stages during pregnancy and lactation. **Int J Clin Exp Med**, v.10, p. 12322-12328.

10 ANEXOS

Anexo 1. Questionários

Anexo 2. Protocolo de Coleta de Leite Humano

Anexo 3. Análises estatísticas

Acesso: <https://drive.google.com/drive/folders/19HWFljNCPZyqZy3VM3MXTSudAgIiCtz>

Anexo 3. Parecer consubstanciado do Comitê de ética em pesquisa da 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

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



Continuação do Parecer: 1.629.127

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 prébióticos 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 arroxeadas) 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

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

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



Continuação do Parecer: 1.629.127

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 maternas, 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 socio-económicas 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

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

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



Continuação do Parecer: 1.629.127

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 |

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

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



Continuação do Parecer: 1.629.127

| Cronograma | Arquivo | Data | Assinatura | 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)

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

Anexo 4. Parecer Consustanciado do Comitê de ética em pesquisa da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro



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



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, entre 0-7 dias pós-parto e no primeiro mês após o nascimento. Em todos os momentos serão coletadas informações sobre o estado nutricional, a saúde mental, parâmetros clínicos (idade, pressão arterial, doenças previas), bioquímicos (exames laboratoriais de rotina) e atividade física. 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



Continuação do Parecer: 1.568.912

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 imunológica do leite humano.
- Estudar a associação entre o estado nutricional (antropometria, fatores clínico/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

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 equilíbrio ecológico da flora intestinal pode ser modulado por modificações dietéticas de maneira favorável.

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



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



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
(Coordenador)

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

Anexo 5. Termo de consentimento livre e esclarecido para participar da pesquisa

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 **5 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 32 dias após o parto;
- Quarto: 6 meses após o parto;
- Quinto: 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 arroxeadas) 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 6. Sintaxes das análises estatísticas – Artigo 1

ANALISES DESCRIPTIVAS

#Tabela 1 – Parte 1 (Dado contínuos)

```
dimnames(C) = list(
  ("Maternal age (years)", "Education (years)", "Parity (livebirth)", "Pre-pregnancy weight (kg)a", "Gestational age at birth (weeks)", "GWG at third-trimester (kg)", "Pre-pregnancy BMI (kg/m2)b"),
  c("Participants With samples (N=100)", "Participants Without samples (N=47*)", "Median IQR", "Mean SD"))

knitr::kable(C, format="html", caption="Table 1. 1. Demographic and anthropometric profile and supplement use of women followed on Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil.") %>% kable_styling(full_width = T) %>%
  footnote(general="IQR: interquartile range; GWG: gestational weight gain; BMI: body mass index; Values of participants with and without samples with common letter was different according Mann-Whitney, P < 0.05. aPre-pregnancy weight was self-reported. bGestational age of the birth was calculated from the first ultrasound, when it was performed until to 22 gestational weeks or according to last menstrual period; cPre-pregnancy BMI was calculated with measured height at 28-47 days postpartum and pre-pregnancy weight.")


```

```
summ(banco$mother_age[banco$status_hmo==1])
summ(banco$schooling[banco$status_hmo==1])
summ(banco$parity[banco$status_hmo==1])
summ(banco$weight_pg[banco$status_hmo==1])
summ(banco$gestational_age_delivery[banco$status_hmo==1])
summ(banco$gwg_3t[banco$status_hmo==1])
summ(banco$bmi_pg[banco$status_hmo==1])
summ(banco$mother_age[banco$status_hmo==0])
summ(banco$schooling[banco$status_hmo==0])
summ(banco$parity[banco$status_hmo==0])
summ(banco$weight_pg[banco$status_hmo==0])
summ(banco$gestational_age_delivery[banco$status_hmo==0])
summ(banco$gwg_3t[banco$status_hmo==0])
summ(banco$bmi_pg[banco$status_hmo==0])
```

#Tabela 1 – teste de comparação (All women)

###Comparando quem tem com quem não tem amostra###

#Idade materna

```
wilcox.test((banco$mother_age[banco$status_hmo==0&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"]),
(banco$mother_age[banco$status_hmo==1&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"]))
```

#Escolaridade

```
wilcox.test((banco$schooling[banco$status_hmo==0&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"]),
(banco$schooling[banco$status_hmo==1&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"]))
```

#Paridade

```
wilcox.test((banco$parity[banco$status_hmo==0&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"]),
(banco$parity[banco$status_hmo==1&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"]))
```

#Peso pré-gestacional

```
wilcox.test((banco$weight_pg[banco$status_hmo==0&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"]),
(banco$weight_pg[banco$status_hmo==1&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"]))
```

#IMC - Pré-gestacional

```
wilcox.test((banco$bmi_pg[banco$status_hmo==0&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"]),
(banco$bmi_pg[banco$status_hmo==1&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"]))
```

#Idade gestacional do parto

```
wilcox.test((banco$gestational_age_delivery[banco$status_hmo==0&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"]),
(banco$gestational_age_delivery[banco$status_hmo==1&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"]))
```

#Ganho de peso

```
wilcox.test((banco$gwg_3t[banco$status_hmo==0&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"]),
(banco$gwg_3t[banco$status_hmo==1&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"]))
```

#Tabela 1 – Parte 2 (Dados categóricos)

```
tab1(banco$cat_bmi_pg[banco$status_hmo==0&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
tab1(banco$cat_bmi_pg[banco$status_hmo==1&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
```

```
tab1(banco$ferro_gestacao[banco$status_hmo==0&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
tab1(banco$ferro_gestacao[banco$status_hmo==1&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
```

```
tab1(banco$acidofolico_gestacao[banco$status_hmo==0&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
tab1(banco$acidofolico_gestacao[banco$status_hmo==1&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
```

```
tab1(banco$dias_antib3[banco$dias_antib3<=30&banco$status_hmo3==1&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
tab1(banco$dias_antib4[banco$dias_antib4<=30&banco$status_hmo4==1&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
```

```
tab1(banco$dias_antib5[banco$dias_antib5<=30&banco$status_hmo5==1&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
```

```
tab1(banco$tipo_aleitamento04o53[banco$status_hmo3==1&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
```

```
tab1(banco$tipo_aleitamento04o54[banco$status_hmo4==1&banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
```

```
tab1(banco$tipo_aleitamento<=4|banco$status_hmo==1&banco$status_gestante<1_d11=="ativa"])
```

Tabela 2 Composição de OLH

```
dimnames(D) = list( c("2'FL","3'FL","DFLac","3'SL","6'SL", "LNT", "LNnT", "LNH", "LNFP I", "LNFP II", "LNFP III", "DFLNT", "FLNH", "DFLNH", "LSTb", "LSTc", "DSLNT", "DSLNH", "FDLSNH", "Total"),
c("2-8 (n=52)", "28-50 (n=74)", "88-119 (n=46)") )
```

```
knitr::kable(D, format="html", caption="Table 2. Variation in total and for secretor status women followed on Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil (n=100).") %>% kable_styling("striped", full_width = T) %>%
add_header_above(c("HMOs (nmol/mL)" = 1, "All women (days postpartum)" = 3)) %>% footnote(general="Note: IQR: interquartile range. HMO values in a row that share a common superscript letter differed according to Friedman posthoc test for multiple comparisons, P < 0.05. DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto- Ntetraose; FDLSNH, fucodisialyllacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNnT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetrose; LSTb, sialyl-lacto-N- tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3FL, 3-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'- sialyllactose.")")
```

#Tabela 2 – teste de comparação (All women)

```
fl2 = matrix(c(banco$`2'FL_7d`, banco$`2'FL_1m`, banco$`2'FL_3m`), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE,
dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=52)", "W2 (n=74)", "W3 (n=46)")))
friedman.test(fl2) posthoc.friedman.nemenyi.test(fl2)
```

```
fl3 = matrix(c(banco$`3FL_7d`, banco$`3FL_1m`, banco$`3FL_3m`), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE,
dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(fl3) posthoc.friedman.nemenyi.test(fl3)
```

```
LNnt = matrix(c(banco$LNnT_7d, banco$LNnT_1m, banco$LNnT_3m), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE,
dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(LNnt) posthoc.friedman.nemenyi.test(LNnt)
```

```
sl3 = matrix(c(banco$`3'SL_7d`, banco$`3'SL_1m`, banco$`3'SL_3m`), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE,
dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(sl3) posthoc.friedman.nemenyi.test(sl3)
```

```
DFLac = matrix(c(banco$DFLac_7d, banco$DFLac_1m, banco$DFLac_3m), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE,
dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(DFLac) posthoc.friedman.nemenyi.test(DFLac)
```

```
sl6 = matrix(c(banco$`6'SL_7d`, banco$`6'SL_1m`, banco$`6'SL_3m`), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE,
dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(sl6) posthoc.friedman.nemenyi.test(sl6)
```

```
ltn = matrix(c(banco$LNT_7d, banco$LNT_1m, banco$LNT_3m), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE, dimnames =
list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(ltn) posthoc.friedman.nemenyi.test(ltn)
```

```
LNFPI = matrix(c(banco$LNFP_I_7d, banco$ LNFP_I_1m, banco$LNFP_I_3m), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE,
dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(LNFP_I) posthoc.friedman.nemenyi.test(LNFP_I)
```

```
LNFP2 = matrix(c(banco$LNFP_II_7d, banco$ LNFP_II_1m, banco$LNFP_II_3m), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE,
dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(LNFP_II) posthoc.friedman.nemenyi.test(LNFP_II)
```

```
LNFP3= matrix(c(banco$LNFP_III_7d, banco$LNFP_III_1m, banco$LNFP_III_3m), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE,
dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(LNFP_III) posthoc.friedman.nemenyi.test(LNFP_III)
```

```
LSTb = matrix(c(banco$LSTb_7d, banco$LSTb_1m, banco$LSTb_3m), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE,
dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(LSTb) posthoc.friedman.nemenyi.test(LSTb)
```

```
LSTc = matrix(c(banco$LSTc_7d, banco$LSTc_1m, banco$LSTc_3m), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE,
dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(LSTc) posthoc.friedman.nemenyi.test(LSTc)
```

```

DFLNT = matrix(c(banco$DFLNT_7d, banco$DFLNT_1m, banco$DFLNT_3m), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE,
dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(DFLNT) posthoc.friedman.nemenyi.test(DFLNT)

LNH = matrix(c(banco$LNH_7d, banco$LNH_1m, banco$LNH_3m), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE,
dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(LNH) posthoc.friedman.nemenyi.test(LNH)

DSLNT = matrix(c(banco$DSLNT_7d, banco$DSLNT_1m, banco$DSLNT_3m), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE,
dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(DSLNT) posthoc.friedman.nemenyi.test(DSLNT)

FLNH = matrix(c(banco$FLNH_7d, banco$FLNH_1m, banco$FLNH_3m), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE,
dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(FLNH) posthoc.friedman.nemenyi.test(FLNH)

DFLNH = matrix(c(banco$DFLNH_7d, banco$DFLNH_1m, banco$DFLNH_3m), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE,
dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(DFLNH) posthoc.friedman.nemenyi.test(DFLNH)

FDSDLNH = matrix(c(banco$FDSDLNH_7d, banco$FDSDLNH_1m, banco$FDSDLNH_3m), nrow = 151, ncol = 3,
byrow = FALSE, dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(FDSDLNH) posthoc.friedman.nemenyi.test(FDSDLNH)

DSLNH = matrix(c(banco$DSLNH_7d, banco$DSLNH_1m, banco$DSLNH_3m), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE,
dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(DSLNH) posthoc.friedman.nemenyi.test(DSLNH)

SUM = matrix(c(banco$SUM_7d, banco$SUM_1m, banco$SUM_3m), nrow = 151, ncol = 3, byrow = FALSE,
dimnames = list(1 : 151, c("W1 (n=43)", "W2 (n=55)", "W3 (n=21)")))
friedman.test(SUM) posthoc.friedman.nemenyi.test(SUM)

```

Tabela 3 – OLH agrupados

```

E = matrix(c(
median_iqr(banco$Sia_7d, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$Fuc_7d, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$small_7d, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$type_1_7d, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$type_2_7d, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_12_7d, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_13_7d, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_26_7d, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$Sia_1m, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$Fuc_1m, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$small_1m, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$type_1_1m, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$type_2_1m, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_12_1m, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_13_1m, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_26_1m, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$Sia_3m, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$Fuc_3m, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$small_3m, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$type_1_3m, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$type_2_3m, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_12_3m, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_13_3m, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_26_3m, na_rm=T, show_n="never", digits = 2),

median_iqr(banco$Sia_7d[banco$HMOSecretor==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$Fuc_7d[banco$HMOSecretor==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),

```

```

median_iqr(banco$small_7d[banco$HMOSecretor==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$type_1_7d[banco$HMOSecretor==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$type_2_7d[banco$HMOSecretor==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_12_7d[banco$HMOSecretor==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_13_7d[banco$HMOSecretor==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_26_7d[banco$HMOSecretor==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$Sia_1m[banco$HMOSecretor_1m==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$Fuc_1m[banco$HMOSecretor_1m==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$small_1m[banco$HMOSecretor_1m==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$type_1_1m[banco$HMOSecretor_1m==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$type_2_1m[banco$HMOSecretor_1m==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_12_1m[banco$HMOSecretor_1m==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_13_1m[banco$HMOSecretor_1m==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_26_1m[banco$HMOSecretor_1m==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$Sia_3m[banco$HMOSecretor_3m==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$Fuc_3m[banco$HMOSecretor_3m==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$small_3m[banco$HMOSecretor_3m==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$type_1_3m[banco$HMOSecretor_3m==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$type_2_3m[banco$HMOSecretor_3m==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_12_3m[banco$HMOSecretor_3m==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_13_3m[banco$HMOSecretor_3m==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_26_3m[banco$HMOSecretor_3m==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),

median_iqr(banco$Sia_7d[banco$HMOSecretor==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$Fuc_7d[banco$HMOSecretor==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$small_7d[banco$HMOSecretor==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$type_1_7d[banco$HMOSecretor==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$type_2_7d[banco$HMOSecretor==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_12_7d[banco$HMOSecretor==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_13_7d[banco$HMOSecretor==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_26_7d[banco$HMOSecretor==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$Sia_1m[banco$HMOSecretor_1m==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$Fuc_1m[banco$HMOSecretor_1m==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$small_1m[banco$HMOSecretor_1m==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$type_1_1m[banco$HMOSecretor_1m==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$type_2_1m[banco$HMOSecretor_1m==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_12_1m[banco$HMOSecretor_1m==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$alfa_13_1m[banco$HMOSecretor_1m==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median.iqr(banco$alfa_26_1m[banco$HMOSecretor_1m==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median.iqr(banco$Sia_3m[banco$HMOSecretor_3m==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median.iqr(banco$Fuc_3m[banco$HMOSecretor_3m==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median.iqr(banco$small_3m[banco$HMOSecretor_3m==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median.iqr(banco$type_1_3m[banco$HMOSecretor_3m==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median.iqr(banco$type_2_3m[banco$HMOSecretor_3m==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median.iqr(banco$alfa_12_3m[banco$HMOSecretor_3m==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median.iqr(banco$alfa_13_3m[banco$HMOSecretor_3m==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median.iqr(banco$alfa_26_3m[banco$HMOSecretor_3m==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
nrow=8, ncol=9, byrow=F)

dimnames(E) = list(
c("HMO-bound sialic acid1", "HMO-bound fucose2", "Small HMOs3", "Type 1", "Type 2", "alpha 1,2", "alpha 1,3",
"alpha 2,6"), c("2-8 (n=52)", "28-50 (n=75)", "88-119 (n=46)", "2-8 (n=46)", "28-50 (n=68)", "88-119 (n=42)",
"2-8 (n=6)", "28-50 (n=7)", "88-119 (n=4)"))

knitr::kable(E, format="html", caption="Table. 3 Variations in HMO group in women followed on Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil (n=100).") %>% kable_styling("striped", full_width = T) %>% add_header_above(c("Variable (nmol/mL)" = 1, "All women (days postpartum)" = 3, "Secretors women (days postpartum)" = 3, "Nonsecretors women (days postpartum)" = 3)) %>% footnote(general="Note: IQR: interquartile range. HMO values in a row that share a common superscript letter differed according to Friedman posthoc test for multiple comparisons, P < 0.05. PP: postpartum. DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-N-tetraose; FDSLNH, fucodisialyllacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNNT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetrose; LSTb, sialyl-lacto-N-tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3FL, 3-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose. 1Calculated as the sum of all sialic acid moieties bound to each HMO. 2Calculated as the sum of all fucose moieties bound to each HMO. 3Calculated as 2'FL + 3FL + 3'SL + 6'SL. 4Calculated as LNT + LNFP I + LNFP II + LSTb + DSLNT. 5Calculated

```

as LNnT + LNFP III + LSTc. 6Calculated as LNFP I + 2'FL. 7Calculated as LNFP III + 3FL. 8Calculated as LSTb + LSTc + 6'SL")

Tabela 3 testes de comparação (All women)###

```

sia = banco %>% select("Sia_7d","Sia_1m","Sia_3m") %>% as.matrix()
friedman.test(sia)
posthoc.friedman.nemenyi.test(sia)

fuc = banco %>% select("Fuc_7d","Fuc_1m","Fuc_3m") %>% as.matrix()
friedman.test(fuc)
posthoc.friedman.nemenyi.test(fuc)

small = banco %>% select("small_7d","small_1m","small_3m") %>% as.matrix()
friedman.test(small)
posthoc.friedman.nemenyi.test(small)

type_1 = banco %>% select("type_1_7d","type_1_1m","type_1_3m") %>% as.matrix()
friedman.test(type_1)
posthoc.friedman.nemenyi.test(type_1)

type_2 = banco %>% select("type_2_7d","type_2_1m","type_2_3m") %>% as.matrix()
friedman.test(type_2)
posthoc.friedman.nemenyi.test(type_2)

alfa_12 = banco %>% select("alfa_12_7d","alfa_12_1m","alfa_12_3m") %>%
  as.matrix() friedman.test(alfa_12)
posthoc.friedman.nemenyi.test(alfa_12)

alfa_13 = banco %>% select("alfa_13_7d","alfa_13_1m","alfa_13_3m") %>%
  as.matrix()
friedman.test(alfa_13)
posthoc.friedman.nemenyi.test(alfa_13)

alfa_26 = banco %>% select("alfa_26_7d","alfa_26_1m","alfa_26_3m") %>%
  as.matrix()
friedman.test(alfa_26)
posthoc.friedman.nemenyi.test(alfa_26)

rm(alfa_26, alfa_13, alfa_12, fuc, sia, small, type_1, type_2)

```

Tabela 3 – teste de comparação (Secretors)###

```

sia_sec = banco %>% select("Sia_7d","Sia_1m","Sia_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>% as.matrix()
friedman.test(sia_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(sia_sec)

fuc_sec = banco %>% select("Fuc_7d","Fuc_1m","Fuc_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>% as.matrix()
friedman.test(fuc_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(fuc_sec)

small_sec = banco %>% select("small_7d","small_1m","small_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
  as.matrix() friedman.test(small_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(small_sec)

type_1_sec = banco %>% select("type_1_7d","type_1_1m","type_1_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
  as.matrix()
friedman.test(type_1_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(type_1_sec)

type_2_sec = banco %>% select("type_2_7d","type_2_1m","type_2_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
  as.matrix()
friedman.test(type_2_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(type_2_sec)

alfa_12_sec = banco %>% select("alfa_12_7d","alfa_12_1m","alfa_12_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
  as.matrix()

```

```

friedman.test(alfa_12_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(alfa_1
2_sec)

alfa_13_sec = banco %>% select("alfa_13_7d","alfa_13_1m","alfa_13_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1)
%>% as.matrix()
friedman.test(alfa_13_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(alfa_1
3_sec)

alfa_26_sec = banco %>% select("alfa_26_7d","alfa_26_1m","alfa_26_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1)
%>% as.matrix()
friedman.test(alfa_26_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(alfa_2
6_sec)

rm(alfa_26_sec,alfa_13_sec,alfa_12_sec,fuc_sec,sia_sec,small_sec,type_1_sec,type_2_sec)

```

#Tabela 3 – Teste de comparação (NonSecretors) ###

```

sia_nonsec = banco %>% select("Sia_7d","Sia_1m","Sia_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==0)
%>% as.matrix()
friedman.test(sia_nonsec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(sia_nonsec)

fuc_nonsec = banco %>% select("Fuc_7d","Fuc_1m","Fuc_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==0) %>%
as.matrix() friedman.test(fuc_nonsec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(fuc_nonsec)

small_nonsec = banco %>% select("small_7d","small_1m","small_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==0)
%>% as.matrix()
friedman.test(small_nonsec) posthoc.friedman.nemenyi.test(small_nonsec)

type_1_nonsec = banco %>% select("type_1_7d","type_1_1m","type_1_3m") %>%
filter(banco$Secretor_status==0) %>% as.matrix()
friedman.test(type_1_nonsec) posthoc.friedman.nemenyi.test(type_1_nonsec)

type_2_nonsec = banco %>% select("type_2_7d","type_2_1m","type_2_3m") %>%
filter(banco$Secretor_status==0) %>% as.matrix()
friedman.test(type_2_nonsec) posthoc.friedman.nemenyi.test(type_2_nonsec)

alfa_12_nonsec = banco %>% select("alfa_12_7d","alfa_12_1m","alfa_12_3m") %>%
filter(banco$Secretor_status==0) %>% as.matrix()
friedman.test(alfa_12_nonsec) posthoc.friedman.nemenyi.test(alfa_12_nonsec)

alfa_13_nonsec = banco %>% select("alfa_13_7d","alfa_13_1m","alfa_13_3m") %>%
filter(banco$Secretor_status==0) %>% as.matrix()
friedman.test(alfa_13_nonsec) posthoc.friedman.nemenyi.test(alfa_13_nonsec)

alfa_26_nonsec = banco %>% select("alfa_26_7d","alfa_26_1m","alfa_26_3m") %>%
filter(banco$Secretor_status==0) %>% as.matrix()
friedman.test(alfa_26_nonsec) posthoc.friedman.nemenyi.test(alfa_26_nonsec)

```

Figura 2 - GGPlot

```

tb3 = banco %>% dplyr::select("record_id", "Secretor_status", "2'FL_7d","3FL_7d","LNnT_7d","3'SL_7d",
"DFLac_7d","6'SL_7d","LNT_7d","LNFPI_7d","LNFPPII_7d","LNFPPIII_7d","LSTb_7d","LSTc_7d","DFLNT_7d",
"LNH_7d","DSLNT_7d","FLNH_7d",
"DFLNH_7d","FDLSLNH_7d","DSLNH_7d","2'FL_1m","3FL_1m","LNnT_1m", "3'SL_1m",
"DFLac_1m","6'SL_1m","LNT_1m","LNFPI_1m","LNFPPII_1m","LNFPPIII_1m","LSTb_1m","LSTc_1m",
"DFLNT_1m","LNH_1m","DSLNT_1m","FLNH_1m", "DFLNH_1m","FDLSLNH_1m","DSLNH_1m",
"2'FL_3m","3FL_3m", "LNnT_3m","3'SL_3m","DFLac_3m","6'SL_3m","LNT_3m","LNFPI_3m",
"LNFPPII_3m","LNFPPIII_3m", "LSTb_3m","LSTc_3m","DFLNT_3m","LNH_3m","DSLNT_3m","FLNH_3m",
"DFLNH_3m","FDLSLNH_3m","DSLNH_3m") # dim = 148 x 58 (=19 x 3)

tb3 = melt(tb3,
id=c("record_id","Secretor_status"))
tab1(banco$Secretor_status)

```

```
FSA::headtail(tb3)
tb3$time=rep(c("t1","t2","t3"), each=1919) # 19 vars x
100 ind= 2812 tb3$time=as.factor(tb3$time)
FSA::headtail(tb3)
tb3$variable = as.factor(sub("[_].*", "", tb3$variable)) # levels(tb3$variable)
FSA::headtail(tb3)
sum_hmo2 = aggregate(value ~ time + variable, data = tb3, median, na.rm = TRUE)
FSA::headtail(sum_hmo2) # 3 w's * 19 vars = 57
sum_hmo2_secretor = aggregate(value ~ time + variable, data = subset(tb3, Secretor_status == 1), median, na.rm = TRUE)
FSA::headtail(sum_hmo2_secretor)
sum_hmo2_nonsecretor = aggregate(value ~ time + variable, data = subset(tb3, Secretor_status == 0), median, na.rm = TRUE)
FSA::headtail(sum_hmo2_nonsecretor)
```

Figura 2 a, b, c Absolute Ggplot

```
colourCount = length(unique(sum_hmo2$variable))
getPalette = colorRampPalette(brewer.pal(12, "Paired")) # "Set3" "Accent" "Set1"

gab1 = ggplot(data=sum_hmo2, aes(x=time, y=value, group=variable, fill=variable)) + geom_bar(stat="identity",
position=position_stack(reverse=T))+ scale_fill_manual(values=getPalette(colourCount), guide =
guide_legend(reverse=T)) + labs(title="A", subtitle = "All women", x="", y="HMO concentration (mmol/L)") +
scale_x_discrete(labels=c("t1"="2-8","t2"="28-50","t3"="88-119")) + scale_y_continuous(limits=c(0, 18.000)) +
theme_minimal() + theme(panel.grid = element_blank(), legend.position="none",
legend.title=element_blank(), text = element_text(size=24), axis.text=element_text(size = 24))

gab2 = ggplot(data=sum_hmo2_secretor, aes(x=time, y=value, group=variable, fill=variable)) +
geom_bar(stat="identity", position=position_stack(reverse=T)) + scale_fill_manual(values=getPalette(colourCount),
guide = guide_legend(reverse=T)) + labs(title="B", subtitle = "Secretors women", x="", y="HMO concentration
(mmol/L)") + scale_x_discrete(labels=c("t1"="2-8","t2"="28-50","t3"="88-119")) + scale_y_continuous(limits=c(0,
18.000)) +
theme_minimal() + labs(y "") + theme(panel.grid = element_blank(), legend.position="none",
legend.title=element_blank(), text = element_text(size=24), axis.text=element_text(size = 24))

gab3 = ggplot(data=sum_hmo2_nonsecretor, aes(x=time, y=value,
group=variable,fill=variable))+geom_bar(stat="identity",
position=position_stack(reverse=T)) + scale_fill_manual(values=getPalette(colourCount), guide =
guide_legend(reverse=T)) + labs(title="C", subtitle = "Nonsecretors women", x="", y="HMO concentration
(mmol/L)") +
scale_x_discrete(labels=c("t1"="2-8","t2"="28-50","t3"="88-119")) + scale_y_continuous(limits=c(0, 18.000)) +
theme_minimal() + labs(y "") + theme(panel.grid = element_blank(), legend.position="right",
legend.title=element_blank(), text = element_text(size=24), axis.text=element_text(size = 24))

dev.new()
gridExtra::grid.arrange(gab1, gab2, gab3, ncol = 3)
```

Figura 2 d, e, f Relative Ggplot

```
gr1 = ggplot(data=sum_hmo2, aes(x=time, y=value, group=variable, fill=variable)) + geom_bar(stat="identity",
position=position_fill(reverse = TRUE)) + scale_y_continuous(labels=scales::percent) +
scale_fill_manual(values=getPalette(colourCount), guide = guide_legend(reverse=T)) + labs(title="D",
subtitle = "All women", x="", y="Relative HMO concentration (% of total)") + scale_x_discrete(labels=c("t1"="2-
8","t2"="28-50","t3"="88-119")) + theme_minimal() + theme(panel.grid = element_blank(), legend.position="none",
legend.title=element_blank(), text = element_text(size=24), axis.text=element_text(size = 24))

gr2 = ggplot(data=sum_hmo2_secretor, aes(x=time, y=value, group=variable, fill=variable)) +
geom_bar(stat="identity", position=position_fill(reverse = TRUE)) + scale_y_continuous(labels=scales::percent) +
scale_fill_manual(values=getPalette(colourCount), guide = guide_legend(reverse=T)) + labs(title="E",
subtitle = "Secretors women", x="", y="Relative HMO concentration (% of total)") +
scale_x_discrete(labels=c("t1"="2-8","t2"="28-50","t3"="88-119")) + theme_minimal() + labs(y "") +
theme(panel.grid = element_blank(), legend.position="none", legend.title=element_blank(), text =
element_text(size=24), axis.text=element_text(size = 24))

gr3 = ggplot(data=sum_hmo2_nonsecretor, aes(x=time, y=value, group=variable,
fill=variable))+geom_bar(stat="identity", position=position_fill(reverse = TRUE)) +
scale_y_continuous(labels=scales::percent)+ scale_fill_manual (values=getPalette(colourCount), guide =
guide_legend(reverse=T))+labs(title="F",
```

```

subtitle = "Nonsecretors women", x="", y="Relative HMO concentration (% of
total)")+scale_x_discrete(labels=c("t1"="2-8","t2"="28-50","t3"="88-119")) +
theme_minimal()+labs(y="") + theme(panel.grid = element_blank(), legend.position="none",
legend.title=element_blank(), text = element_text(size=24),axis.text=element_text(size = 24))

dev.new()
gridExtra::grid.arrange(gr1, gr2, gr3, ncol = 3)

#Figura 3 - Box Plots#
### criar variável "Secretor_status" (1 = secretoras, 0 = não secretoras) e filtrar quem não tem amostra de leite
("!is.na(hmo_status"))

banco = banco %>% mutate( Secretor_status = case_when(
HMOSecretor == 1 | HMOSecretor_1m == 1 | HMOSecretor_3m == 1 ~ 1, HMOSecretor == 0 | HMOSecretor_1m
== 0 | HMOSecretor_3m == 0 ~ 0) ) %>% filter(!is.na(Secretor_status))

tb2 = (banco %>% dplyr::select("record_id",
"2'FL_7d","3FL_7d","LNnT_7d","3'SL_7d",
"DFLac_7d","6'SL_7d","LNT_7d","LNFPPI_7d","LNFPPII_7d","LNFPPIII_7d",
"LSTb_7d","LSTc_7d","DFLNT_7d","LNH_7d","DSLNT_7d","FLNH_7d",
"DFLNH_7d","FDSLNH_7d","DSLNH_7d",

"2'FL_1m","3FL_1m","LNnT_1m","3'SL_1m",
"DFLac_1m","6'SL_1m","LNT_1m","LNFPPI_1m","LNFPPII_1m","LNFPPIII_1m",
"LSTb_1m","LSTc_1m","DFLNT_1m","LNH_1m","DSLNT_1m","FLNH_1m",
"DFLNH_1m","FDSLNH_1m","DSLNH_1m",

"2'FL_3m","3FL_3m","LNnT_3m","3'SL_3m",
"DFLac_3m","6'SL_3m","LNT_3m","LNFPPI_3m","LNFPPII_3m","LNFPPIII_3m",
"LSTb_3m","LSTc_3m","DFLNT_3m","LNH_3m","DSLNT_3m","FLNH_3m",
"DFLNH_3m","FDSLNH_3m","DSLNH_3m",
"Secretor_status"))

tb2 = melt(tb2, id = c("record_id", "Secretor_status"))
tb2$time=rep(c("2-8 days", "28-50 days", "88-119 days"), each = 1919) # (100 mulheres * 19HMO) * 3 time points =
5700
tb2$time=as.factor(tb2$time)
tb2$variable = as.factor(sub("[_.]*", "", 
tb2$variable)) glimpse(tb2)
dev.new()
tb2 %>%
ggplot(aes(x = time, y = value, fill = as.factor(Secretor_status))) + geom_boxplot(na.rm = T) + theme_bw() +
theme(strip.background = element_rect(fill = "#f0f0f0"), legend.justification=c("right", "bottom"),
legend.position=c(.97,.03)) + scale_fill_manual(values = c("#e9e9e9","#666666"), name="Maternal Secretor Status",
breaks=c("0", "1"), labels=c("Non Secretor", "Secretor")) + labs(x = NULL, y = "HMO concentration (mmol/L)") +
facet_wrap(~variable, scales = "free") + theme(plot.title = element_text(family = "Times New Roman", size = 9)) +
theme(axis.title.y = element_text(family = "Times New Roman", size = 12),
axis.title.x = element_text(family = "Times New Roman",size = 9),
title = element_text(family = "Times New Roman", face = 'bold', size = 9))

```

#Tabela 4 - HMO diversity and evenness indexes#

```

# 1 to 7 days postpartum
tb4_w1 = banco %>% dplyr::select("2'FL_7d","3FL_7d","LNnT_7d","3'SL_7d","DFLac_7d","6'SL_7d","LNT_7d",
"LNFPPI_7d","LNFPPII_7d","LNFPPIII_7d",
"LSTb_7d","LSTc_7d","DFLNT_7d","LNH_7d","DSLNT_7d","FLNH_7d",
"DFLNH_7d","FDSLNH_7d","DSLNH_7d") # 583:601, 928:946
glimpse(tb4_w1) names(tb4_w1) summary(tb4_w1)
banco$shannon_div_w1 = diversity(tb4_w1, index="shannon")
mean_sd(banco$shannon_div_w1, na_rm=T, digits=2)
banco$simpson_inv_w1 = diversity(tb4_w1, index="simpson") mean_sd(banco$simpson_inv_w1, na_rm=T,
digits=2)
shannon_even_sites_w1 = BiodiversityR::diversityresult(tb4_w1, index="Jevenness", method="each site", digits=2)
summ(shannon_even_sites_w1)
mean_sd(shannon_even_sites_w1$Jevenness, na_rm=T, digits=2) banco$shannon_even_sites_w1 =
shannon_even_sites_w1$Jevenness
banco$pielou_even_w1 = banco$shannon_div_w1/log(specnumber(tb4_w1)) mean_sd(banco$pielou_even_w1,

```

```

na_rm=T, digits=2)

# 30 to 45 days postpartum
tb4_w2 = banco %>% dplyr::select("2'FL_1m","3FL_1m","LNnT_1m","3'SL_1m",
"DFLac_1m","6'SL_1m","LNT_1m","LNFPI_1m","LNFPII_1m","LNFPIII_1m",
"LSTb_1m","LSTc_1m","DFLNT_1m","LNH_1m","DSLNT_1m","FLNH_1m",
"DFLNH_1m","FDLSNH_1m","DSLNH_1m")
banco$shannon_div_w2 = diversity(tb4_w2, index="shannon")
mean_sd(banco$shannon_div_w2, na_rm=T, digits=2)
banco$simpson_inv_w2 = diversity(tb4_w2, index="invsimpson") mean_sd(banco$simpson_inv_w2, na_rm=T,
digits=2)
shannon_even_sites_w2 = diversityresult(tb4_w2, index="Jevenness", method="each site", digits=2)
summ(shannon_even_sites_w2)
mean_sd(shannon_even_sites_w2$Jevenness, na_rm=T, digits=2)
banco$shannon_even_sites_w2 = shannon_even_sites_w2$Jevenness
banco$pielou_even_w2 = banco$shannon_div_w2/log(specnumber(tb4_w2))
mean_sd(banco$pielou_even_w2, na_rm=T, digits=2)

# 3 months postpartum
tb4_w3 = banco %>%
dplyr::select("2FL_3m","3FL_3m","LNnT_3m","3'SL_3m","DFLac_3m","6'SL_3m","LNT_3m",
"LNFPI_3m","LNFPII_3m","LNFPIII_3m", "LSTb_3m","LSTc_3m","DFLNT_3m","LNH_3m","DSLNT_3m",
"FLNH_3m", "DFLNH_3m","FDLSNH_3m","DSLNH_3m")
banco$shannon_div_w3 = diversity(tb4_w3, index="shannon")
mean_sd(banco$shannon_div_w3, na_rm=T, digits=2)
banco$simpson_inv_w3 = diversity(tb4_w3, index="invsimpson")
mean_sd(banco$simpson_inv_w3, na_rm=T, digits=2)
shannon_even_sites_w3 = diversityresult(tb4_w3, index="Jevenness", method="each site", digits=2)
summ(shannon_even_sites_w3)
mean_sd(shannon_even_sites_w3$Jevenness, na_rm=T, digits=2)
banco$shannon_even_sites_w3 = shannon_even_sites_w3$Jevenness
banco$pielou_even_w3 =
banco$shannon_div_w3/log(specnumber(tb4_w3))
mean_sd(banco$pielou_even_w3, na_rm=T, digits=2)

```

#Tabela 4 - Exportando

```

G = matrix(c(
median_iqr(banco$shannon_div_w1, na_rm=T, show_n="never", digits = 3),
median_iqr(banco$simpson_inv_w1, na_rm=T, show_n="never", digits = 3),
median_iqr(shannon_even_sites_w1$Jevenness, na_rm=T, show_n="never", digits = 3),
median_iqr(banco$Evenness_7d, na_rm=T, show_n="never", digits = 3),
median_iqr(banco$pielou_even_w1, na_rm=T, show_n="never", digits = 3),

median_iqr(banco$shannon_div_w2, na_rm=T, show_n="never", digits = 3),
median_iqr(banco$simpson_inv_w2, na_rm=T, show_n="never", digits = 3),
median_iqr(shannon_even_sites_w2$Jevenness, na_rm=T, show_n="never", digits = 3),
median_iqr(banco$Evenness_1m, na_rm=T, show_n="never", digits = 3),
median_iqr(banco$pielou_even_w2, na_rm=T, show_n="never", digits = 3),

median_iqr(banco$shannon_div_w3, na_rm=T, show_n="never", digits = 3),
median_iqr(banco$simpson_inv_w3, na_rm=T, show_n="never", digits = 3),
median_iqr(shannon_even_sites_w3$Jevenness, na_rm=T, show_n="never", digits = 3),
median_iqr(banco$Evenness_3m, na_rm=T, show_n="never", digits = 3),
median_iqr(banco$pielou_even_w3, na_rm=T, show_n="never", digits = 3)),
nrow=5, ncol=3, byrow=F)

dimnames(G) = list(c("Shannon entropy", "Inverse simpson", "Shannon evenness", "Simpson evenness", "Pielou
evenness"), c("2-8 days postpartum (n=52)", "28-50 days postpartum (n=75)", "88-119 days postpartum (n=46)"))

knitr::kable(G, format="html",
caption="Table 4. Variation in HMO diversity and evenness indexes among women participating in the study.") %>% kable_styling("striped", full_width = T) %>% footnote(general="Note: All values are median and interquartile range. HMO: human milk oligosaccharide. Values in a row that share a common superscript letter differed with the use of Friedman post-hoc procedures for multiple comparisons, P<0.05.")

```

#Tabela 4 – Teste de comparação - Friedman entre os indices #

```

## Shannon diversity

```

```

shannon_diversity = banco %>% select("shannon_div_w1", "shannon_div_w2", "shannon_div_w3") %>% as.matrix()
friedman.test(shannon_diversity)
posthoc.friedman.nemenyi.test(shannon_diversity)
posthoc.friedman.conover.test(y=shannon_diversity, p.adjust="BH")
posthoc.friedman.conover.test(y=shannon_diversity, p.adjust="bonferroni")
posthoc.friedman.conover.test(y=shannon_diversity, p.adjust="none")

## Simpson
simpson = banco %>% select("Diversity_7d", "Diversity_1m", "Diversity_3m") %>%
as.matrix()
friedman.test(simpson)
posthoc.friedman.nemenyi.test(simpson)

```

```

##shannon_even
shannon_even = banco %>% select("shannon_even_sites_w1",
"shannon_even_sites_w2", "shannon_even_sites_w3") %>%
as.matrix()
friedman.test(shannon_even)
posthoc.friedman.nemenyi.test(shannon_even)
posthoc.friedman.conover.test(y=shannon_even, p.adjust="BH")
posthoc.friedman.conover.test(y=shannon_even, p.adjust="bonferroni")
posthoc.friedman.conover.test(y=shannon_even, p.adjust="none")

```

```

##simpson eveness
even_simson = banco %>% select("Evenness_7d", "Evenness_1m", "Evenness_3m") %>% as.matrix()
friedman.test(even_simson)
posthoc.friedman.nemenyi.test(even_simson)

```

```

##pielou_even
pielou_even = banco %>% select("pielou_even_w1", "pielou_even_w2", "pielou_even_w3") %>% as.matrix()
friedman.test(pielou_even)
posthoc.friedman.nemenyi.test(pielou_even)
posthoc.friedman.conover.test(y=pielou_even, p.adjust="BH")
posthoc.friedman.conover.test(y=pielou_even, p.adjust="bonferroni")
posthoc.friedman.conover.test(y=pielou_even, p.adjust="none")

```

#Figuras 4, 5 e 6 Heat maps / Corplots#

```

library(corrplot)
banco$"shannon_even_7d"= shannon_even_sites_w1$Jevenness
banco$"shannon_even_1m"= shannon_even_sites_w2$Jevenness
banco$"shannon_even_3m"= shannon_even_sites_w3$Jevenness
# Correlogram with the significance test #

```

#Figura 4

```

bd_w1=banco %>% dplyr::select("mother_age", "schooling", "parity", "weight_pg", "bmi_pg",
"gestational_age_delivery", "gwg_3t", "ferro_gestacao",
"acidofolico_gestacao", "shannon_div_w1", "simpson_inv_w1", "shannon_even_7d",
"Evenness_7d", "pielou_even_w1", "2FL_7d", "3FL_7d", "LNNT_7d", "3'SL_7d", "DFLac_7d", "6'SL_7d", "LNT_7d",
"LNFP_7d", "LNFPII_7d", "LNFPIII_7d", "LSTb_7d", "LSTc_7d", "DFLNT_7d", "LNH_7d", "DSLNT_7d",
"FLNH_7d",
"DFLNH_7d", "FDSLNH_7d", "DSLNH_7d", "SUM_7d")

bd_w1=dplyr::rename(bd_w1,
"Maternal age"="mother_age", "Education"="schooling", "Parity"="parity", "Pre-pregnancy weight"="weight_pg",
"Pre-pregnancy BMI"="bmi_pg", "Gestational age at birth"="gestational_age_delivery", "Gestational weight gain"="gwg_3t",
"Pregnancy Iron supplement"="ferro_gestacao", "Pregnancy Folic acid supplement"="acidofolico_gestacao", "Shannon Entropy v1"= shannon_div_w1, "Inverse Simpson v1"= simpson_inv_w1, "Shannon Evenness v1"=
shannon_even_7d, "Simpson Evenness v1"= Evenness_7d, "Pielou Evenness v1"= pielou_even_w1, "2'FL v1"="2FL_7d", "3FL v1"="3FL_7d", "LNNT v1"=LNNT_7d, "3'SL v1"="3'SL_7d", "DFLac v1"=DFLac_7d, "6'SL v1"="6'SL_7d", "LNT v1"=LNT_7d, "LNFP_7d"=LNFP_7d, "LNFPII v1"=LNFPII_7d, "LNFPIII v1"=LNFPIII_7d, "LSTb v1"=LSTb_7d, "LSTc v1"=LSTc_7d, "DFLNT v1"=DFLNT_7d, "LNH v1"=LNH_7d,
"DSLNT v1"=DSLNT_7d, "FLNH v1"=FLNH_7d, "DFLNH v1"=DFLNH_7d, "FDSLNH v1"=FDSLNH_7d,
"DSLNH v1"=DSLNH_7d, "Total HMO v1"=SUM_7d)

res1 = cor.mtest(bd_w1, conf.level = .99, method="spearman", exact=F, use =
"pairwise.complete.obs")

```

```
dev.new()
corpl_w1 = corrplot(cor(bd_w1, method = "spearman", use = "pairwise.complete.obs"), method = "circle", type = "upper", diag = F, tl.col = "black", number.cex = .85, tl.cex = .85, tl.srt=90, p.mat = res1$p, sig.level = 0.01, insig = "blank")
```

#Figura 5

```
bd_w2=banco %>% dplyr::select("mother_age", "schooling", "parity", "weight_pg", "bmi_pg",
"gestational_age_delivery", "gwg_3t",
"ferro_gestacao", "acidofolico_gestacao", "shannon_div_w2", "simpson_inv_w2", "shannon_even_1m",
"Evenness_1m", "pielou_even_w2", "2'FL_1m", "3FL_1m", "LNnT_1m", "3'SL_1m", "DFLac_1m", "6'SL_1m",
"LNT_1m", "LNFPI_1m", "LNFPII_1m", "LNFPIII_1m", "LSTb_1m", "LSTc_1m", "DFLNT_1m", "LNH_1m",
"DSLNT_1m", "FLNH_1m", "DFLNH_1m", "FDSLNH_1m", "DSLNH_1m", "SUM_1m")

bd_w2=dplyr::rename(bd_w2,
"Maternal age"="mother_age", "Education"="schooling", "Parity"="parity", "Pre-pregnancy weight"="weight_pg",
"Pre-pregnancy BMI"="bmi_pg", "Gestational age at birth"="gestational_age_delivery",
"Gestational weight gain"="gwg_3t", "Pregnancy Iron suplement"="ferro_gestacao", "Pregnancy Folic acid
suplement"="acidofolico_gestacao", "Shannon Entropy v2"= shannon_div_w2, "Inverse Simpson v2"=
simpson_inv_w2, "Shannon Evenness v2"= shannon_even_1m, "Simpson Evenness v2"= Evenness_1m, "Pielou
Evenness v2"= pielou_even_w2, "2'FL v2"= "2'FL_1m", "3FL v2"= "3FL_1m", "LNnT v2"= LNnT_1m, "3'SL
v2"= "3'SL_1m", "DFLac v2"= DFLac_1m, "6'SL v2"= "6'SL_1m", "LNT v2"= LNT_1m, "LNFPI v2"= LNFPI_1m,
"LNFPII v2"= LNFPII_1m, "LNFPIII v2"= LNFPIII_1m, "LSTb v2"= LSTb_1m, "LSTc v2"= LSTc_1m, "DFLNT
v2"= DFLNT_1m, "LNH v2"= LNH_1m, "DSLNT v2"= DSLNT_1m, "FLNH v2"= FLNH_1m, "DFLNH
v2"= DFLNH_1m, "FDSLNH v2"= FDSLNH_1m, "DSLNH v2"= DSLNH_1m, "Total HMO v2"= SUM_1m)

res2 = cor.mtest(bd_w2, conf.level = .99, method="spearman", exact=F, use = "pairwise.complete.obs")
dev.new()
corpl_w2 = corrplot(cor(bd_w2, method = "spearman", use = "pairwise.complete.obs"), method = "circle", type = "upper", diag = F, tl.col = "black", number.cex = .85, tl.cex = .85, tl.srt=90, p.mat = res1$p, sig.level = 0.01, insig = "blank")
```

#Figura 6

```
bd_w3=banco %>% dplyr::select("mother_age", "schooling", "parity", "weight_pg", "bmi_pg",
"gestational_age_delivery", "gwg_3t",
"ferro_gestacao", "acidofolico_gestacao", "shannon_div_w3", "simpson_inv_w3", "shannon_even_3m",
"Evenness_3m", "pielou_even_w3", "2'FL_3m", "3FL_3m", "LNnT_3m", "3'SL_3m", "DFLac_3m", "6'SL_3m",
"LNT_3m", "LNFPI_3m", "LNFPII_3m", "LNFPIII_3m", "LSTb_3m", "LSTc_3m", "DFLNT_3m", "LNH_3m",
"DSLNT_3m", "FLNH_3m", "DFLNH_3m", "FDSLNH_3m", "DSLNH_3m", "SUM_3m")

bd_w3=dplyr::rename(bd_w3, "Maternal age"="mother_age", "Education"="schooling", "Parity"="parity", "Pre-
pregnancy weight"="weight_pg", "Pre-pregnancy BMI"="bmi_pg", "Gestational age at
birth"="gestational_age_delivery", "Gestational weight gain"="gwg_3t", "Pregnancy Iron
suplement"="ferro_gestacao", "Pregnancy Folic acid suplement"= "acidofolico_gestacao", "Shannon Entropy v3"=
shannon_div_w3, "Inverse Simpson v3"= simpson_inv_w3, "Shannon Evenness v3"= shannon_even_3m, "Simpson
Evenness v3"= Evenness_3m, "Pielou Evenness v3"= pielou_even_w3, "2'FL v3"= "2'FL_3m", "3FL v3"= "3FL_3m",
"LNnT v3"= LNnT_3m, "3'SL v3"= "3'SL_3m", "DFLac v3"= DFLac_3m, "6'SL v3"= "6'SL_3m", "LNT v3"= LNT_3m,
"LNFPI v3"= LNFPI_3m, "LNFPII v3"= LNFPII_3m, "LNFPIII v3"= LNFPIII_3m, "LSTb v3"= LSTb_3m, "LSTc
v3"= LSTc_3m, "DFLNT v3"= DFLNT_3m, "LNH v3"= LNH_3m, "DSLNT v3"= DSLNT_3m, "FLNH
v3"= FLNH_3m, "DFLNH v3"= DFLNH_3m, "FDSLNH v3"= FDSLNH_3m, "DSLNH v3"= DSLNH_3m, "Total HMO
v3"= SUM_3m)

res3 = cor.mtest(bd_w3, conf.level = .99, method="spearman", exact=F, use = "pairwise.complete.obs")
dev.new()
corpl_w3 = corrplot(cor(bd_w3, method = "spearman", use = "pairwise.complete.obs"), method = "circle", type = "upper", diag = F, tl.col = "black", number.cex = .85, tl.cex = .85, tl.srt=90, p.mat = res1$p, sig.level = 0.01, insig = "blank")
library(gridExtra)

dev.new()
grid.arrange(corpl_w1, corpl_w2, corpl_w3, ncol = 3)
```

#Tabelas 5, 6, 7 e 8 - NMF

```
library(NMF)
tb_nmf = banco %>%
dplyr::select("2'FL_7d", "3FL_7d", "LNnT_7d", "3'SL_7d", "DFLac_7d", "6'SL_7d", "LNT_7d", "LNFPI_7d", "LNFPII_7d
", "LNFPIII_7d",
```

```

"LSTb_7d","LSTc_7d","DFLNT_7d","LNH_7d","DSLNT_7d","FLNH_7d","DFLNH_7d","FDSLNH_7d",
"DSLNH_7d",

"2'FL_1m","3FL_1m","LNnT_1m","3'SL_1m","DFLac_1m","6'SL_1m","LNT_1m","LNFP1_1m","LNFP1I_1m","LN
FPIII_1m", "LSTb_1m","LSTc_1m","DFLNT_1m","LNH_1m","DSLNT_1m","FLNH_1m",
"DFLNH_1m","FDSLNH_1m","DSLNH_1m",

"2'FL_3m","3FL_3m","LNnT_3m","3'SL_3m","DFLac_3m","6'SL_3m","LNT_3m","LNFP1_3m","LNFP1I_3m","LN
FPIII_3m", "LSTb_3m","LSTc_3m","DFLNT_3m","LNH_3m","DSLNT_3m","FLNH_3m",
"DFLNH_3m","FDSLNH_3m","DSLNH_3m","record_id", "cat_bmi_pg", "parity_cat", "mother_age_cat") #tbl_nmf
= melt(tb_nmf, id=c("record_id"))

tbl_nmf = gather(tb_nmf, key = variable, value = value, 1:57)
tbl_nmf$onda=factor(rep(c("w1","w2","w3"), each=2869)) # 19 vars x 100 ind
tbl_nmf$variable = as.factor(sub("[].*", "", tbl_nmf$variable))
head(tbl_nmf)
tbw_nmf = spread(tb_nmf, key = variable, value = value)
names(tbw_nmf)
tbw_nmf = tbw_nmf[complete.cases(tbw_nmf[6:24]),]
summary(tbw_nmf)

##### OTHERS #####
tb2 = banco %>% dplyr::select("record_id", "Secretor_status", "gwg_3t",
"cat_bmi_pg","2'FL_7d","3FL_7d","LNnT_7d","3'SL_7d",
"DFLac_7d","6'SL_7d","LNT_7d","LNFP1_7d","LNFP1I_7d","LSTb_7d","LSTc_7d", "DFLNT_7d",
"LNH_7d","DSLNT_7d","FLNH_7d", "DFLNH_7d","FDSLNH_7d","DSLNH_7d","SUM_7d",

"2'FL_1m","3FL_1m","LNnT_1m","3'SL_1m","DFLac_1m","6'SL_1m","LNT_1m","LNFP1_1m","LNFP1I_1m",
"LNFP1I_1m", "LSTb_1m","LSTc_1m","DFLNT_1m","LNH_1m","DSLNT_1m","FLNH_1m","DFLNH_1m",
"FDSLNH_1m","DSLNH_1m","SUM_1m",

"2'FL_3m","3FL_3m","LNnT_3m","3'SL_3m","DFLac_3m","6'SL_3m","LNT_3m","LNFP1_3m","LNFP1I_3m",
"LNFP1I_3m", "LSTb_3m","LSTc_3m","DFLNT_3m","LNH_3m","DSLNT_3m","FLNH_3m","DFLNH_3m",
"FDSLNH_3m","DSLNH_3m", "SUM_3m")

tb2 = melt(tb2, id=c("record_id", "Secretor_status", "gwg_3t", "cat_bmi_pg"))
tb2$onda=rep(c("w1","w2","w3"), each=3020) # 100 women x 20 HMOs (SUM
included) tb2$onda=as.factor(tb2$onda)
tb2$variable = as.factor(sub("[].*", "", tb2$variable)) # levels(tb2$variable)
headTail(tb2)

dados = spread(tb2, variable, value) headTail(dados)
dados.env = dados %>% select(record_id, Secretor_status, onda, SUM, gwg_3t, cat_bmi_pg)
headTail(dados.env)
dados = dados %>% select(-record_id, -Secretor_status, -onda, -SUM, -gwg_3t, -cat_bmi_pg)
headTail(dados)
dados = dados[complete.cases(dados),]
dados.env = dados.env[complete.cases(dados.env$SUM),]

##### Estimating the factorization rank ##### Deve ser rodado somente uma vez para definir o estimador
estim.r <- nmf(dados, 2:19, nrun=50, seed=123456, method="brunet") # demora!
plot(estim.r)
# consensusmap(estim.r, annCol=dados, labCol=NA, labRow=NA)

##### Iniciar #####
dados_t = t(dados)
res = nmf(dados_t, 3, method="brunet", seed = 0711) res
summary(res)
featureScore(res)
basismap(res)

#Tabela 5 – Time postpartum#
tb5_w1 = banco %>% dplyr::select("2'FL_7d","3FL_7d","LNnT_7d","3'SL_7d",
"DFLac_7d","6'SL_7d","LNT_7d","LNFP1_7d","LNFP1I_7d","LNFP1I_7d",
"LSTb_7d","LSTc_7d","DFLNT_7d","LNH_7d","DSLNT_7d","FLNH_7d",
"DFLNH_7d","FDSLNH_7d","DSLNH_7d")

```

```

tb5_w1 = tb5_w1[complete.cases(tb5_w1),]
tb5_w1 = t(tb5_w1)
res_w1 = nmf(tb5_w1, 3, method="brunet", seed = 0711) res_w1
summary(res_w1)
featureScore(res_w1)

tb5_w2 = banco %>% dplyr::select("2'FL_1m","3FL_1m","LNnT_1m","3'SL_1m",
"DFLac_1m","6'SL_1m","LNT_1m","LNFP_I_1m","LNFP_II_1m","LNFP_III_1m",
"LSTb_1m","LSTc_1m","DFLNT_1m","LNH_1m","DSLNT_1m","FLNH_1m",
"DFLNH_1m","FDLSNH_1m","DSLNH_1m")

tb5_w2=tb5_w2[complete.cases(tb5_w2),]
tb5_w2 = t(tb5_w2)
res_w2 = nmf(tb5_w2, 3, method="brunet", seed = 0711) res_w2
summary(res_w2)
featureScore(res_w2)

tb5_w3 = banco %>% dplyr::select("2'FL_3m","3FL_3m","LNnT_3m","3'SL_3m",
"DFLac_3m","6'SL_3m","LNT_3m","LNFP_I_3m","LNFP_II_3m","LNFP_III_3m",
"LSTb_3m","LSTc_3m","DFLNT_3m","LNH_3m","DSLNT_3m","FLNH_3m",
"DFLNH_3m","FDLSNH_3m","DSLNH_3m")

tb5_w3=tb5_w3[complete.cases(tb5_w3),]
tb5_w3 = t(tb5_w3)
res_w3 = nmf(tb5_w3, 3, method="brunet", seed = 0711) res_w3
summary(res_w3)
featureScore(res_w3)

F=data.frame(round(featureScore(res_w1),2),round(featureScore(res_w2),2),round(featureScore(res_w3),2),
round(featureScore(res),2))

dimnames(F)=list(c("2'FL","3FL","LNnT","3'SL","DFLac","6'SL","LNT","LNFP_I","LNFP_II","LNFP_III","LSTb",
"LSTc","DFLNT","LNH","DSLNT","FLNH","DFLNH","FDLSNH","DSLNH"), c("2-8 days postpartum (n=52)", "28-47 days postpartum (n=74)", "88-119 days postpartum (n=46)", "All women (n=100)"))

```

knitr::kable(F, format="html", caption="Table 5. NMF scores describing time-postpartum period for individual HMOs.") %>% kable_styling("striped", full_width = T) %>% footnote(general="NMF scores represent the probability of contribution to (and importance of) a specified HMO variable to the basis component. HMO: human milk oligosaccharide. 2'FL: 2'-fucosyllactose. 3FL: 3-fucosyllactose. LNnT: lacto-N- neotetraose. 3'SL: 3'-sialyllactose. DFLac: difucosyllactose. 6'SL: 6'-sialyllactose. LNT: lacto-N-tetrose. LNFP: lacto-N-fucopentaose. LSTb: sialyl-lacto-N-tetraose b. LSTc: sialyl-lacto-N-tetraose c. DFLNT: difucosyllacto-N- tetrose. LNH: lacto-N-hexaose. DSLNT: disialyllacto-Ntetraose. FLNH: fucosyllacto-N-hexaose. DFLNH: difucosyllacto-N- hexaose. FDLSNH: fucodisialyllacto-N-hexaose. DSLNH: disialyllacto-N-hexaose.")

```
rm(tb5_w1,tb5_w2,tb5_w3,res_w1,res_w2,res_w3, F)
```

#Tabela 6 – Maternal age #

```
levels(tbw_nmf$mother_age_cat)
```

```

nmf_mtage1 = tbw_nmf %>% filter(mother_age_cat=="1")%>% select(6:24)
nmf_mtage1=t(nmf_mtage1)
res_mtage1 = nmf(nmf_mtage1, 3, method="brunet", seed =0711)
featureScore(res_mtage1)

```

```

nmf_mtage2 = tbw_nmf %>% filter(mother_age_cat=="2") %>% select(6:24)
nmf_mtage2 = t(nmf_mtage2)
res_mtage2 = nmf(nmf_mtage2, 3, method="brunet", seed = 0711)
featureScore(res_mtage2)

```

```

nmf_mtage3 = tbw_nmf %>% filter(mother_age_cat=="3") %>% select(6:24)
nmf_mtage3 = t(nmf_mtage3)
res_mtage3 = nmf(nmf_mtage3, 3, method="brunet", seed = 0711)
featureScore(res_mtage3)

```

```

nmf_mtage4 = tbw_nmf %>% filter(mother_age_cat=="4") %>% select(6:24)
nmf_mtage4 = t(nmf_mtage4)

```

```

res_mtage4 = nmf(nmf_mtage4, 3, method="brunet", seed = 0711)
featureScore(res_mtage4)

rm(nmf_mtage1, nmf_mtage2, nmf_mtage3, nmf_mtage4)

M = data.frame(round(featureScore(res_mtage1),2),
round(featureScore(res_mtage2),2), round(featureScore(res_mtage3),2), round(featureScore(res_mtage4),2))

dimnames(M) = list(c("2'FL","3FL","LNnT","3'SL","DFLac","6'SL","LNT","LNFP I","LNFP II","LNFP III","LSTb",
"LSTc","DFLNT","LNH","DSLNT","FLNH","DFLNH","FDSLNH","DSLNH"),c("18.0-22.5 (n=26)", "22.7-26.6
(n=27)",
"26.9-31.4 (n=21)", "31.5-40.0 (n=27)") ) # table(tbw_nmf$mother_age_cat, useNA="always") #

tapply(banco$mother_age, banco$mother_age_cat, summary)

knitr::kable(M, format="html", caption="Table 6. NMF scores describing maternal age quartiles for individual HMOs.") %>% kable_styling("striped", full_width = T) %>% footnote(general="NMF scores represent the probability of contribution to (and importance of) a specified HMO variable to the basis component. HMO: human milk oligosaccharide. 2'FL: 2'-fucosyllactose. 3FL: 3-fucosyllactose. LNnT: lacto-N- neotetraose. 3'SL: 3'-sialyllactose. DFLac: difucosyllactose. 6'SL: 6'-sialyllactose. LNT: lacto-N-tetrose. LNFP: lacto-N-fucopentaose. LSTb: sialyl-lacto-N-tetraose b. LSTc: sialyl-lacto-N-tetraose c. DFLNT: difucosyllacto-N- tetrose. LNH: lacto-N-hexaose. DSLNT: disialyllacto-Ntetraose. FLNH: fucosyllacto-N-hexaose. DFLNH: difucosyllacto-N- hexaose. FDSLNH: fucodisialyllacto-N-hexaose. DSLNH: disialyllacto-N-hexaose.")

knitr::kable(M, format="html", caption="Table 6. NMF scores describing maternal age quartiles for individual HMOs.") %>% kable_styling("striped", full_width = T) %>% footnote(general="NMF scores represent the probability of contribution to (and importance of) a specified HMO variable to the basis component. HMO: human milk oligosaccharide. 2'FL: 2'-fucosyllactose. 3FL: 3-fucosyllactose. LNnT: lacto-N- neotetraose. 3'SL: 3'-sialyllactose. DFLac: difucosyllactose. 6'SL: 6'-sialyllactose. LNT: lacto-N-tetrose. LNFP: lacto-N-fucopentaose. LSTb: sialyl-lacto-N-tetraose b. LSTc: sialyl-lacto-N-tetraose c. DFLNT: difucosyllacto-N- tetrose. LNH: lacto-N-hexaose. DSLNT: disialyllacto-Ntetraose. FLNH: fucosyllacto-N-hexaose. DFLNH: difucosyllacto-N- hexaose. FDSLNH: fucodisialyllacto-N-hexaose. DSLNH: disialyllacto-N-hexaose.")

rm(res_mtage1, res_mtage2, res_mtage3, res_mtage4, M)

quantile(banco$mother_age,probs=seq(0,1,0.25),na.rm=T)
summ(banco$mother_age[banco$mother_age_cat==1&banco$status_hmo==1])
summ(banco$mother_age[banco$mother_age_cat==2&banco$status_hmo==1])
summ(banco$mother_age[banco$mother_age_cat==3&banco$status_hmo==1])
summ(banco$mother_age[banco$mother_age_cat==4&banco$status_hmo==1])

#Tabela 7 – BMI status #
levels(tbw_nmf$bmi_cat)

##Conferindo os ns das categorias
tab1(banco$cat_bmi_pg[banco$status_hmo==1])

nmf_bmi_cat1 = tbw_nmf %>% filter(cat_bmi_pg=="underweight") %>% select(6:24)
nmf_bmi_cat1 = t(nmf_bmi_cat1)
res_bmi_cat1 = nmf(nmf_bmi_cat1, 3, method="brunet", seed = 0711)
featureScore(res_bmi_cat1)

nmf_bmi_cat2 = tbw_nmf %>% filter(cat_bmi_pg=="normal weight") %>% select(6:24)
nmf_bmi_cat2 = t(nmf_bmi_cat2)
res_bmi_cat2 = nmf(nmf_bmi_cat2, 3, method="brunet", seed = 0711)
featureScore(res_bmi_cat2)

nmf_bmi_cat3 = tbw_nmf %>% filter(cat_bmi_pg=="overweight") %>% select(6:24)
nmf_bmi_cat3 = t(nmf_bmi_cat3)
res_bmi_cat3 = nmf(nmf_bmi_cat3, 3, method="brunet", seed = 0711)
featureScore(res_bmi_cat3)

nmf_bmi_cat4 = tbw_nmf %>% filter(cat_bmi_pg=="obese") %>% select(6:24)
nmf_bmi_cat4 = t(nmf_bmi_cat4)
res_bmi_cat4 = nmf(nmf_bmi_cat4, 3, method="brunet", seed = 0711)
featureScore(res_bmi_cat4)

rm(nmf_bmi_cat1, nmf_bmi_cat2, nmf_bmi_cat3, nmf_bmi_cat4)

I = data.frame(round(featureScore(res_bmi_cat1),2), round(featureScore(res_bmi_cat2),2),
round(featureScore(res_bmi_cat3),2),round(featureScore(res_bmi_cat4),2))

dimnames(I) = list(
c("2'FL","3FL","LNnT","3'SL","DFLac","6'SL","LNT","LNFP I","LNFP II","LNFP III","LSTb",
"LSTc","DFLNT","LNH","DSLNT","FLNH","DFLNH","FDSLNH","DSLNH"),

```

```

("Under weight (n=3)", "Normal weight (n=47)", "Overweight (n=29), Obesity (n=15)") # table(tbw_nmf$bmi_cat,
useNA="always") # tapply(banco$bmi_pg, banco$bmi_cat, summary)

knitr::kable(I, format="html", caption="Table 7. NMF scores describing BMI for individual HMOs.") %>%
kable_styling("striped", full_width = T) %>% footnote(general="NMF scores represent the probability of contribution
to (and importance of) a specified HMO variable to the basis component. HMO: human milk oligosaccharide. 2'FL: 2'-fucosyllactose. 3FL: 3-fucosyllactose. LNNT: lacto-N- neotetraose. 3'SL: 3'-sialyllactose. DFLac: difucosyllactose.
6'SL: 6'-sialyllactose. LNT: lacto-N-tetrose. LNFP: lacto-N-fucopentaose. LSTb: sialyl-lacto-N-tetraose b. LSTc:
sialyl-lacto-N-tetraose c. DFLNT: difucosyllacto-N- tetrose. LNH: lacto-N-hexaose. DSLNT: disialyllacto-Ntetraose.
FLNH: fucosyllacto-N-hexaose. DFLNH: difucosyllacto-N- hexaose. FDSLNH: fucodisialyllacto-N-hexaose. DSLNH:
disialyllacto-N-hexaose.") tab1(banco$cat_bmi_pg[banco$status_hmo==1])

rm(res_bmi_cat1, res_bmi_cat2, res_bmi_cat3, res_bmi_cat4, I)

#Tabela 8 – Parity#
levels(tbw_nmf$parity_cat)
##Conferindo os ns das categorias
tab1(banco$parity_cat[banco$status_hmo==1])

nmf_parity1 = tbw_nmf %>% filter(parity_cat==0) %>% select(6:24)
nmf_parity1 = t(nmf_parity1)
res_parity1 = nmf(nmf_parity1, 3, method="brunet", seed = 0711)
featureScore(res_parity1)

nmf_parity2 = tbw_nmf %>% filter(parity_cat=="1") %>% select(6:24)
nmf_parity2 = t(nmf_parity2)
res_parity2 = nmf(nmf_parity2, 3, method="brunet", seed = 0711)
featureScore(res_parity2)

nmf_parity3 = tbw_nmf %>% filter(parity_cat=="2") %>% select(6:24)
nmf_parity3 = t(nmf_parity3)
res_parity3 = nmf(nmf_parity3, 3, method="brunet", seed = 0711)
featureScore(res_parity3)

nmf_parity4 = tbw_nmf %>% filter(parity_cat=="3") %>% select(6:24)
nmf_parity4 = t(nmf_parity4)
res_parity4 = nmf(nmf_parity4, 3, method="brunet", seed = 0711)
featureScore(res_parity4)

rm(nmf_parity1, nmf_parity2, nmf_parity3, nmf_parity4)

H = data.frame(round(featureScore(res_parity1),2), round(featureScore(res_parity2),2),
round(featureScore(res_parity3),2), round(featureScore(res_parity4),2))

dimnames(H) = list(c("2'FL", "3FL", "LNNT", "3'SL", "DFLac", "6'SL", "LNT", "LNFP I", "LNFP II", "LNFP III", "LSTb",
"LSTc", "DFLNT", "LNH", "DSLNT", "FLNH", "DFLNH", "FDSLNH", "DSLNH"),
c("0 (n=53)", "1 (n=31)", "2 (n=13)", ">=3 (n=3)"))

table(tbw_nmf$parity_cat, useNA="always") # tapply(banco$parity, banco$parity_cat, summary)

knitr::kable(H, format="html", caption="Table 8. NMF scores describing parity for individual HMOs.") %>%
kable_styling("striped", full_width = T) %>% footnote(general="NMF scores represent the probability of contribution
to (and importance of) a specified HMO variable to the basis component. HMO: human milk oligosaccharide. 2'FL: 2'-fucosyllactose. 3FL: 3-fucosyllactose. LNNT: lacto-N- neotetraose. 3'SL: 3'-sialyllactose. DFLac: difucosyllactose.
6'SL: 6'-sialyllactose. LNT: lacto-N-tetrose. LNFP: lacto-N-fucopentaose. LSTb: sialyl-lacto-N-tetraose b. LSTc:
sialyl-lacto-N-tetraose c. DFLNT: difucosyllacto-N- tetrose. LNH: lacto-N-hexaose. DSLNT: disialyllacto-Ntetraose.
FLNH: fucosyllacto-N-hexaose. DFLNH: difucosyllacto-N- hexaose. FDSLNH: fucodisialyllacto-N-hexaose. DSLNH:
disialyllacto-N-hexaose.")

rm(res_parity1, res_parity2, res_parity3, H) tab1(banco$parity[banco$status_hmo==1])

```

#Tabela Suplementar 1

```
D = matrix(c(
median_iqr(banco$`2'FL_7d`[banco$status_hmo3==1&banco$Secretor_status==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$`3'FL_7d`[banco$status_hmo3==1&banco$Secretor_status==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$DFLac_7d[banco$status_hmo3==1&banco$Secretor_status==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$`3'SI_7d`[banco$status_hmo3==1&banco$Secretor_status==1], na_rm=T, show_n="never", digits = 2))
```

```
median_iqr(banco$`2FL_7d`[banco$status_hmo3==1&banco$Secretor_status==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$`3FL_7d`[banco$status_hmo3==1&banco$Secretor_status==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$DFLac_7d[banco$status_hmo3==1&banco$Secretor_status==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
```



```
median_iqr(banco$LSTc_3m[banco$status_hmo5==1&banco$Secretor_status==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$DSLNT_3m[banco$status_hmo5==1&banco$Secretor_status==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$DSLNH_3m[banco$status_hmo5==1&banco$Secretor_status==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$FDSDLNH_3m[banco$status_hmo5==1&banco$Secretor_status==0],na_rm=T,show_n="never", digits = 2),
median_iqr(banco$SUM_3m[banco$status_hmo5==1&banco$Secretor_status==0], na_rm=T, show_n="never", digits = 2)),
nrow=20, ncol=6, byrow=F)
```

```
dimnames(D) = list( c("2'FL","3FL","DFLac","3'SL","6'SL", "LNT", "LNnT","LNH", "LNFP I","LNFP II","LNFP III","DFLNT","FLNH","DFLNH","LSTb","LSTc","DSLNT","DSLNH","FDSDLNH","Total"),
c("2-8 (n=46)", "28-50 (n=68)", "88-119 (n=42)", "2-8 (n=6)", "28-50 (n=7)", "88-119 (n=4)"))
```

knitr::kable(D, format="html", caption="Table 2. Variation in total and for secretor status women followed on Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil (n=100).") %>% kable_styling("striped", full_width = T) %>%
add_header_above(c("HMOs (nmol/mL)" = 1, " Secretors women (days postpartum)" = 3, "Nonsecretors women (days postpartum)" = 3)) %>% footnote(general="Note: IQR: interquartile range. HMO values in a row that share a common superscript letter differed according to Friedman posthoc test for multiple comparisons, P < 0.05. DFLac, difucosyllactose; DFLNH, difucosyllacto-N-hexaose; DFLNT, difucosyllacto-N-tetrose; DSLNH, disialyllacto-N-hexaose; DSLNT, disialyllacto-N-tetraose; FDSDLNH, fucodisialyllacto-N-hexaose; FLNH, fucosyllacto-N-hexaose; HMO, human milk oligosaccharide; LNFP, lacto-N-fucopentaose; LNH, lacto-N-hexaose; LNnT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetrose; LSTb, sialyl-lacto-N-tetraose b; LSTc, sialyl-lacto-N-tetraose c; 2'FL, 2'-fucosyllactose; 3FL, 3-fucosyllactose; 3'SL, 3'-sialyllactose; 6'SL, 6'-sialyllactose.")

#Tabela 2 – teste de comparação

```
#####Secretor#####

```

```
fl2_sec = banco %>% select("2'FL_7d", "2'FL_1m", "2'FL_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
as.matrix() friedman.test(fl2_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(fl2_sec)
```

```
fl3_sec = banco %>% select("3FL_7d", "3FL_1m", "3FL_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
as.matrix() friedman.test(fl3_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(fl3_sec)
```

```
LNnt_sec = banco %>% select("LNnT_7d", "LNnT_1m", "LNnT_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
as.matrix()
friedman.test(LNnt_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(LNnt_sec)
```

```
sl3_sec = banco %>% select("3'SL_7d", "3'SL_1m", "3'SL_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
as.matrix() friedman.test(sl3_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(sl3_sec)
```

```
DFLac_sec = banco %>% select("DFLac_7d", "DFLac_1m", "DFLac_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
%>% as.matrix()
friedman.test(DFLac_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(DFLac_sec)
```

```
sl6_sec = banco %>% select("6'SL_7d", "6'SL_1m", "6'SL_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
as.matrix() friedman.test(sl6_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(sl6_sec)
posthoc.friedman.conover.test(y=sl6_sec, p.adjust="BH")
posthoc.friedman.conover.test(y=sl6_sec, p.adjust="bonferroni")
posthoc.friedman.conover.test(y=sl6_sec, p.adjust="none")
```

```
ltn_sec = banco %>% select("LNT_7d", "LNT_1m", "LNT_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
as.matrix() friedman.test(ltn_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(ltn_sec)
```

```
LNFPI_sec = banco %>% select("LNFPI_7d", "LNFPI_1m", "LNFPI_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
%>% as.matrix() friedman.test(LNFPI_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(LNFPI_sec)
```

```
LNFPII_sec = banco %>% select("LNFPII_7d", "LNFPII_1m", "LNFPII_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
%>% as.matrix()
```

```

friedman.test(LNFP2_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(LNFP2_sec)

LNFP3_sec = banco %>% select("LNFPIII_7d","LNFPIII_1m","LNFPIII_3m") %>%
filter(banco$Secretor_status==1) %>% as.matrix()
friedman.test(LNFP3_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(LNFP3_sec)

LSTb_sec = banco %>% select("LSTb_7d","LSTb_1m","LSTb_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
as.matrix()
friedman.test(LSTb_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(LSTb_sec)

LSTc_sec = banco %>% select("LSTc_7d","LSTc_1m","LSTc_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
as.matrix()
friedman.test(LSTc_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(LSTc_sec)

DFLNT_sec = banco %>% select("DFLNT_7d","DFLNT_1m","DFLNT_3m") %>%
filter(banco$Secretor_status==1) %>% as.matrix()
friedman.test(DFLNT_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(DFLNT_sec)

LNH_sec = banco %>% select("LNH_7d","LNH_1m","LNH_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
as.matrix() friedman.test(LNH_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(LNH_sec)
posthoc.friedman.conover.test(y=LNH_sec, p.adjust="BH")
posthoc.friedman.conover.test(y=LNH_sec, p.adjust="bonferroni")
posthoc.friedman.conover.test(y=LNH_sec, p.adjust="none")

DSLNT_sec = banco %>% select("DSLNT_7d","DSLNT_1m","DSLNT_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
%>% as.matrix() friedman.test(DSLNT_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(DSLNT_sec)

FLNH_sec = banco %>% select("FLNH_7d","FLNH_1m","FLNH_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
as.matrix() friedman.test(FLNH_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(FLNH_sec)
posthoc.friedman.conover.test(y=FLNH_sec,
p.adjust="BH")
posthoc.friedman.conover.test(y=FLNH_sec,
p.adjust="bonferroni")
posthoc.friedman.conover.test(y=FLNH_sec,
p.adjust="none")

DFLNH_sec = banco %>% select("DFLNH_7d","DFLNH_1m","DFLNH_3m") %>%
filter(banco$Secretor_status==1) %>% as.matrix() friedman.test(DFLNH_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(DFLNH_sec)
posthoc.friedman.conover.test(y=DFLNH_sec,
p.adjust="BH")
posthoc.friedman.conover.test(y=DFLNH_sec,
p.adjust="bonferroni")
posthoc.friedman.conover.test(y=DFLNH_sec,
p.adjust="none")

FDSDLNH_sec = banco %>% select("FDSDLNH_7d","FDSDLNH_1m","FDSDLNH_3m") %>%
filter(banco$Secretor_status==1) %>% as.matrix()
friedman.test(FDSDLNH_sec) posthoc.friedman.nemenyi.test(FDSDLNH_sec)

DSLNH_sec = banco %>% select("DSLNH_7d","DSLNH_1m","DSLNH_3m") %>%
filter(banco$Secretor_status==1) %>% as.matrix() friedman.test(DSLNH_sec)
posthoc.friedman.conover.test(y=DSLNH_sec,
p.adjust="BH")
posthoc.friedman.conover.test(y=DSLNH_sec,
p.adjust="bonferroni")
posthoc.friedman.conover.test(y=DSLNH_sec,
p.adjust="none")

```

```

posthoc.friedman.nemenyi.test(DSLNH_sec)

SUM_sec = banco %>% select("SUM_7d","SUM_1m","SUM_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==1) %>%
as.matrix() friedman.test(SUM_sec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(SUM_sec)

#####Não secretoras#####
fl2_nonsec = banco %>% select("2'FL_7d", "2'FL_1m","2'FL_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==0) %>%
as.matrix() friedman.test(fl2_nonsec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(fl2_nonsec)

fl3_nonsec = banco %>% select("3FL_7d","3FL_1m","3FL_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==0) %>%
as.matrix() friedman.test(fl3_nonsec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(fl3_nonsec)

LNnt_nonsec = banco %>% select("LNnT_7d","LNnT_1m","LNnT_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==0) %>%
%>% as.matrix() friedman.test(LNnt_nonsec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(LNnt_nonsec)

sl3_nonsec = banco %>% select("3'SL_7d","3'SL_1m","3'SL_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==0) %>%
as.matrix() friedman.test(sl3_nonsec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(sl3_nonsec)

DFLac_nonsec = banco %>% select("DFLac_7d","DFLac_1m","DFLac_3m") %>%
filter(banco$Secretor_status==0) %>% as.matrix()
friedman.test(DFLac_nonsec) posthoc.friedman.nemenyi.test(DFLac_nonsec)

sl6_nonsec = banco %>% select("6'SL_7d","6'SL_1m","6'SL_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==0) %>%
as.matrix() friedman.test(sl6_nonsec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(sl6_nonsec)

ltn_nonsec = banco %>% select("LNT_7d","LNT_1m","LNT_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==0) %>%
as.matrix() friedman.test(ltn_nonsec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(ltn_nonsec)

LNFPI_nonsec = banco %>% select("LNFPI_7d","LNFPI_1m","LNFPI_3m") %>%
filter(banco$Secretor_status==0) %>% as.matrix()
friedman.test(LNFPI_nonsec) posthoc.friedman.nemenyi.test(LNFPI_nonsec)

LNFP2_nonsec = banco %>% select("LNFP2_7d","LNFP2_1m","LNFP2_3m") %>%
filter(banco$Secretor_status==0) %>% as.matrix()
friedman.test(LNFP2_nonsec) posthoc.friedman.nemenyi.test(LNFP2_nonsec)

LNFP3_nonsec= banco %>% select("LNFP3_7d","LNFP3_1m","LNFP3_3m") %>%
filter(banco$Secretor_status==0) %>% as.matrix()
friedman.test(LNFP3_nonsec) posthoc.friedman.nemenyi.test(LNFP3_nonsec)

LSTb_nonsec = banco %>% select("LSTb_7d","LSTb_1m","LSTb_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==0) %>%
as.matrix()
friedman.test(LSTb_nonsec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(LSTb_nonsec)

LSTc_nonsec = banco %>% select("LSTc_7d","LSTc_1m","LSTc_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==0) %>%
as.matrix()
friedman.test(LSTc_nonsec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(LSTc_nonsec)

DFLNT_nonsec = banco %>% select("DFLNT_7d","DFLNT_1m","DFLNT_3m") %>%
filter(banco$Secretor_status==0) %>% as.matrix()
friedman.test(DFLNT_nonsec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(DFLNT_nonsec)

LNH_nonsec = banco %>% select("LNH_7d","LNH_1m","LNH_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==0) %>%
as.matrix()
friedman.test(LNH_nonsec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(LNH_nonsec)

```

```
DSLNT_nonsec = banco %>% select("DSLNT_7d","DSLNT_1m","DSLNT_3m") %>%
filter(banco$Secretor_status==0) %>% as.matrix()
friedman.test(DSLNT_nonsec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(DSLNT_nonsec)

FLNH_nonsec = banco %>% select("FLNH_7d","FLNH_1m","FLNH_3m") %>% filter(banco$Secretor_status==0)
%>% as.matrix()
friedman.test(FLNH_nonsec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(FLNH_nonsec)

DFLNH_nonsec = banco %>% select("DFLNH_7d","DFLNH_1m","DFLNH_3m") %>%
filter(banco$Secretor_status==0) %>% as.matrix()
friedman.test(DFLNH_nonsec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(DFLNH_nonsec)

FDSDLNH_nonsec = banco %>% select("FDSDLNH_7d","FDSDLNH_1m","FDSDLNH_3m") %>%
filter(banco$Secretor_status==0) %>% as.matrix()
friedman.test(FDSDLNH_nonsec)
posthoc.friedman.nemenyi.test(FDSDLNH_nonsec)
```

FIM

Anexo 7. Sintaxes das análises estatísticas – Artigo 2

Tabela 1 – Parte 1: Participantes que tem ou não amostras de leite

```
A = data.frame(matrix(c(
  median_iqr(banco$idade_mae_calc1[banco$status_amostra==1],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$anos_de_estudo1[banco$status_amostra==1],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$new_kcal_totalgest[banco$status_amostra==1],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$peso_pg1[banco$status_amostra==1],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$gwg[banco$status_amostra==1],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$retencao_peso[banco$status_amostra==1],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$bmi_pg[banco$status_amostra==1],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$idade_mae_calc1[banco$status_amostra==2],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$anos_de_estudo1[banco$status_amostra==2],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$new_kcal_totalgest[banco$status_amostra==2],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$peso_pg1[banco$status_amostra==2],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$gwg[banco$status_amostra==2],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$retencao_peso[banco$status_amostra==2],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$bmi_pg[banco$status_amostra==2],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  nrow=7, ncol=2, byrow=F))

dimnames(A) = list( c("Maternal age* (years)", "Education* (years)", "Pregnancy dietary intake (kcal)", "Pre-pregnancy weight* (kg)", "Gestational weight gain (kg)", "Weight retention (kg)", "Pre-pregnancy BMI (kg/m2)"),
  c("Participants With samples (N=74)", "Participants Without samples (N=73)"))

### test TABLE 1 ###
#Comparando quem tem com quem não tem amostra
B= data.frame(c(
  wilcox.test((banco$idade_mae_calc1[banco$status_amostra==1]),
  (banco$idade_mae_calc1[banco$status_amostra==2]))$p.value,
  wilcox.test((banco$anos_de_estudo1[banco$status_amostra==1]),
  (banco$anos_de_estudo1[banco$status_amostra==2]))$p.value,
  wilcox.test((banco$new_kcal_totalgest[banco$status_amostra==1]),
  (banco$new_kcal_totalgest[banco$status_amostra==2]))$p.value,
  wilcox.test((banco$peso_pg1[banco$status_amostra==1]),
  (banco$peso_pg1[banco$status_amostra==2]))$p.value,
  wilcox.test((banco$gwg[banco$status_amostra==1]),
  (banco$gwg[banco$status_amostra==2]))$p.value,
  wilcox.test((banco$retencao_peso[banco$status_amostra==1]),
  (banco$retencao_peso[banco$status_amostra==2]))$p.value,
  wilcox.test((banco$bmi_pg[banco$status_amostra==1]),
  (banco$bmi_pg[banco$status_amostra==2]))$p.value))

#Colocando os pvalores do teste de Mann-whitney na tabela
A$pvalue=B[1:7,]

knitr::kable(A, format="html",
  caption="Table 1. 1. Demographic and anthropometric profile of women followed on Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil.") %>%
  kable_styling(full_width = T) %>%
  footnote(general="IQR: interquartile range; GWG: gestational weight gain; BMI: body mass index. Bold Values indicate difference between participants with and without samples according Mann-Whitney, considering p-value < 0.05.
  *Baseline information. Because of missing data: 1 n=71, 2 n=68, 3 n=72, 4 n=26, 5 n=73, 6 n=3.")
```

#####Variáveis categóricas # dofile stata

```
tab1(banco$cat_bmi_pg[banco$status_amostra==2], cum.percent = !any(is.na(banco$cat_bmi_pg)))
tab1(banco$cat_bmi_pg[banco$status_amostra==1])

tab1(banco$parity_cat[banco$status_amostra==2])
tab1(banco$parity_cat[banco$status_amostra==1])

tab1(banco$ferro_gestacao[banco$status_amostra==2])
tab1(banco$ferro_gestacao[banco$status_amostra==1])

tab1(banco$acidofolico_gestacao[banco$status_amostra==2])
```

```

tab1(banco$acidofolico_gestacao[banco$status_amostra==1])

tab1(banco$dias_antib3[banco$dias_antib3<=30 & banco$status_hmo3==1 & banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
tab1(banco$dias_antib4[banco$dias_antib4<=30 & banco$status_hmo4==1 & banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
tab1(banco$dias_antib5[banco$dias_antib5<=30 & banco$status_hmo5==1 & banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])

tab1(banco$tipo_aleitamento04o53[banco$status_hmo3==1 & banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
tab1(banco$tipo_aleitamento04o54[banco$status_hmo4==1 & banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
tab1(banco$tipo_aleitamento04o55[banco$status_hmo5==1 & banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])

```

Tabela 1 – Parte 2: Participantes que completaram o acompanhamento vs participantes com perda de seguimento

```

A = data.frame(matrix(c(
  median_iqr(banco$idade_mae_calc1[banco$follow_up_full==1],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$anos_de_estudo1[banco$follow_up_full==1],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$new_kcal_totalgest[banco$follow_up_full==1],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$peso_pg1[banco$follow_up_full==1],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$gwg[banco$follow_up_full==1],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$sg_parto[banco$follow_up_full==1],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$bmi_pg[banco$follow_up_full==1],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),

  median_iqr(banco$idade_mae_calc1[banco$follow_up_full==0],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$anos_de_estudo1[banco$follow_up_full==0],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$new_kcal_totalgest[banco$follow_up_full==0],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$peso_pg1[banco$follow_up_full==0],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$gwg[banco$follow_up_full==0],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$sg_parto[banco$follow_up_full==0],na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco$bmi_pg[banco$follow_up_full==0],na_rm=T, show_n="never", digits = 1)),
  nrow=7, ncol=2, byrow=F))

dimnames(A) = list(
  c("Maternal age* (years)", "Education* (years)", "Pregnancy dietary intake (kcal)", "Pre-pregnancy weight* (kg)",
    "Gestational weight gain (kg)", "Gestational age at birth (weeks)", "Pre-pregnancy BMI (kg/m2)"),
  c("Participants With samples (N=74)", "Participants Without samples (N=73)"))

### test TABLE 1 ###
#Comparando quem tem com quem não tem amostra
B= data.frame(c(
  wilcox.test((banco$idade_mae_calc1[banco$follow_up_full==1],
    (banco$idade_mae_calc1[banco$follow_up_full==0]))$p.value,
  wilcox.test((banco$anos_de_estudo1[banco$follow_up_full==1],
    (banco$anos_de_estudo1[banco$follow_up_full==0]))$p.value,
  wilcox.test((banco$new_kcal_totalgest[banco$follow_up_full==1],
    (banco$new_kcal_totalgest[banco$follow_up_full==0]))$p.value,
  wilcox.test((banco$peso_pg1[banco$follow_up_full==1],
    (banco$peso_pg1[banco$follow_up_full==0]))$p.value,
  wilcox.test((banco$gwg[banco$follow_up_full==1],
    (banco$gwg[banco$follow_up_full==0]))$p.value,
  wilcox.test((banco$sg_parto[banco$follow_up_full==1],
    (banco$sg_parto[banco$follow_up_full==0]))$p.value,
  wilcox.test((banco$bmi_pg[banco$follow_up_full==1],
    (banco$bmi_pg[banco$follow_up_full==0]))$p.value))

#Colocando os pvalores do teste de Mann-whitney na tabela
A$pvalue=B[1:7,]

knitr::kable(A, format="html", caption="Table 1. 1. Demographic and anthropometric profile of women followed on Brazilian cohort. Rio de Janeiro, Brazil.") %>% kable_styling(full_width = T) %>% footnote(general="IQR: interquartile range; GWG: gestational weight gain; BMI: body mass index. Bold Values indicate difference between participants with and without samples according Mann-Whitney, considering p-value < 0.05. *Baseline information. Because of missing data: 1 n=71, 2 n=68, 3 n=72, 4 n=26, 5 n=73, 6 n=3.")

```

```
#Variáveis categóricas # dofile stata
tab1(banco$cat_bmi_pg[banco$status_amostra==2], cum.percent = !any(is.na(banco$cat_bmi_pg)))
tab1(banco$cat_bmi_pg[banco$status_amostra==1])

tab1(banco$parity_cat[banco$status_amostra==2])
tab1(banco$parity_cat[banco$status_amostra==1])

tab1(banco$ferro_gestacao[banco$status_amostra==2])
tab1(banco$ferro_gestacao[banco$status_amostra==1])

tab1(banco$acidofolico_gestacao[banco$status_amostra==2])
tab1(banco$acidofolico_gestacao[banco$status_amostra==1])

tab1(banco$dias_antib3[banco$dias_antib3<=30 & banco$status_hmo3==1 &
banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
tab1(banco$dias_antib4[banco$dias_antib4<=30 & banco$status_hmo4==1 &
banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
tab1(banco$dias_antib5[banco$dias_antib5<=30 & banco$status_hmo5==1 &
banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])

tab1(banco$tipo_aleitamento04o53[banco$status_hmo3==1 & banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
tab1(banco$tipo_aleitamento04o54[banco$status_hmo4==1 & banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
tab1(banco$tipo_aleitamento04o55[banco$status_hmo5==1 & banco$status_gestantep1_d11=="ativa"])
```

Tabela 2 – Informações das crianças

```
tab2 = data.frame(matrix(c(
median_iqr(banco_c$idade_bebe4,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
median_iqr(banco_c$peso_crianca_p24,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
median_iqr(banco_c$length4,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
median_iqr(banco_c$head4,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
median_iqr(banco_c$bmi4,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),

median_iqr(banco_c$idade_bebe6,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
median_iqr(banco_c$peso_crianca_p26,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
median_iqr(banco_c$length6,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
median_iqr(banco_c$head6,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
median_iqr(banco_c$bmi6,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),

median_iqr(banco_c$idade_bebe7,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
median_iqr(banco_c$peso_crianca_p27,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
median_iqr(banco_c$length7,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
median_iqr(banco_c$head7,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
median_iqr(banco_c$bmi7,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
nrow=5, ncol=3, byrow=F))

dimnames(tab2a) = list(
c("Age (days)", "Weight (g)", "Length (cm)", "Head circumference (cm)", "BMI (kg/m2"),
c("1 month", "6 months", "12 months"))

knitr::kable(tab2a, format="html",
caption="Table 2. Infant anthropometric measurements and indexes at birth and 1, 6 and 12 months.") %>%
kable_styling("striped", full_width = T) %>%
footnote(general="IQR: interquartile range; BMI: body mass index; Because of missing data: 1 n=72, 2 n=73. ")

##Dados categóricos

tab1(banco_c$sex4)
tab1(banco_c$sex6)
tab1(banco_c$sex7)
```

```

tab1(banco_c$pesoid4_cat)
tab1(banco_c$compid4_cat)
tab1(banco_c$cefalid4_cat)
tab1(banco_c$imcid4_cat)

tab1(banco_c$pesoid6_cat)
tab1(banco_c$compid6_cat)
tab1(banco_c$cefalid6_cat)
tab1(banco_c$imcid6_cat)

tab1(banco_c$pesoid7_cat)
tab1(banco_c$compid7_cat)
tab1(banco_c$cefalid7_cat)
tab1(banco_c$imcid7_cat)

#tabela escore-z
library(qwraps2)

tab3 = data.frame(matrix(c(
  median_iqr(banco_c$zwawho4,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco_c$zhawho4,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco_c$zbawho4,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco_c$zhcawho4,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),

  median_iqr(banco_c$zwawho6,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco_c$zhawho6,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco_c$zbawho6,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco_c$zhcawho6,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),

  median_iqr(banco_c$zwawho7,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco_c$zhawho7,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco_c$zbawho7,na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  median_iqr(banco_c$zhcawho7),na_rm=T, show_n="never", digits = 1),
  nrow=4, ncol=3, byrow=F))

dimnames(tab3) = list(c("Z-score weight for age","Z-score length for age","Z-score BMI for age3",
  "Z-score head circumference for age"),
  c("1 month", "6 months", "12 months"))

knitr::kable(tab3, format="html", caption="Table 2. Infant anthropometric measurements and indexes at birth and 1, 6
and 12 months.") %>% kable_styling("striped",full_width = T) %>% footnote(general="IQR: interquartile range;
BMI: body mass index;Because of missing data: 1 n=72, 2 n=73. ")

```

Figura 2 – DAG

Figura 3 – Curvas de sobrevida

```

#Colando exposição (HMO) desenvolvimento e covariáveis ao tempo long
sobrevida <- data.frame(c(banco$record_id,banco$record_id,banco$record_id))
sobrevida$id <- c(banco$record_id,banco$record_id,banco$record_id)
sobrevida$tempo_dias <- c(banco$idade_bebe4,banco$idade_bebe6,banco$idade_bebe7)
sobrevida$tempo_semanas <-
c(round(banco$idade_semanas4),round(banco$idade_semanas6),round(banco$idade_semanas7))
sobrevida$idade_meses <- c(banco$idadecri4,banco$idadecri6,banco$idadecri7)
sobrevida$start <- c(banco$tempo_start1,banco$tempo_start2,banco$tempo_start3)
sobrevida$stop <- c(banco$tempo_stop1,banco$tempo_stop2,banco$tempo_stop3)
sobrevida$ame <- c(banco$ame,banco$ame,banco$ame)
sobrevida$HMOSecretor4 <- c(banco$HMOSecretor4,banco$HMOSecretor4,banco$HMOSecretor4)

sobrevida$FL2 <- c(log10(banco$FL2nmolmL4),log10(banco$FL2nmolmL4),log10(banco$FL2nmolmL4))
sobrevida$FL3<- c(log10(banco$FL3nmolmL4),log10(banco$FL3nmolmL4),log10(banco$FL3nmolmL4))
sobrevida$LNnT<- c(log10(banco$LNnTnmolmL4),log10(banco$LNnTnmolmL4),log10(banco$LNnTnmolmL4))
sobrevida$SL3<- c(log10(banco$SL3nmolmL4),log10(banco$SL3nmolmL4),log10(banco$SL3nmolmL4))

```

```

sobrevida$DFLac<- c(log10(banco$DFLacnmolmL4),log10(banco$DFLacnmolmL4),log10(banco$DFLacnmolmL4))
sobrevida$SL6<- c(log10(banco$SL6nmolmL4),log10(banco$SL6nmolmL4),log10(banco$SL6nmolmL4))
sobrevida$LNT<- c(log10(banco$LNTnmolmL4),log10(banco$LNTnmolmL4),log10(banco$LNTnmolmL4))
sobrevida$LNFI<- c(log10(banco$LNFIInmolmL4),log10(banco$LNFIInmolmL4),log10(banco$LNFIInmolmL4))
sobrevida$LNFII<-
c(log10(banco$LNFIInmolmL4),log10(banco$LNFIInmolmL4),log10(banco$LNFIInmolmL4))
sobrevida$LNFIII<-
c(log10(banco$LNFIInmolmL4),log10(banco$LNFIInmolmL4),log10(banco$LNFIInmolmL4))
sobrevida$LSTb<- c(log10(banco$LSTbnmolmL4),log10(banco$LSTbnmolmL4),log10(banco$LSTbnmolmL4))
sobrevida$LSTc<- c(log10(banco$LSTcnmolmL4),log10(banco$LSTcnmolmL4),log10(banco$LSTcnmolmL4))
sobrevida$DFLNT<-
c(log10(banco$DFLNTnmolmL4),log10(banco$DFLNTnmolmL4),log10(banco$DFLNTnmolmL4))
sobrevida$LNH<- c(log10(banco$LNHnmolmL4),log10(banco$LNHnmolmL4),log10(banco$LNHnmolmL4))
sobrevida$DSLNT<-
c(log10(banco$DSLNTnmolmL4),log10(banco$DSLNTnmolmL4),log10(banco$DSLNTnmolmL4))
sobrevida$FLNH<- c(log10(banco$FLNHnmolmL4),log10(banco$FLNHnmolmL4),log10(banco$FLNHnmolmL4))
sobrevida$DFLNH<-
c(log10(banco$DFLNHnmolmL4),log10(banco$DFLNHnmolmL4),log10(banco$DFLNHnmolmL4))
sobrevida$FDSLNH<-
c(log10(banco$FDSLNHnmolmL4),log10(banco$FDSLNHnmolmL4),log10(banco$FDSLNHnmolmL4))
sobrevida$DSLNH<-
c(log10(banco$DSLNHnmolmL4),log10(banco$DSLNHnmolmL4),log10(banco$DSLNHnmolmL4))
sobrevida$SUM<- c(log10(banco$SUMnmolmL4),log10(banco$SUMnmolmL4),log10(banco$SUMnmolmL4))
sobrevida$Sia<- c(log10(banco$SianmolmL4),log10(banco$SianmolmL4),log10(banco$SianmolmL4))
sobrevida$Fuc<- c(log10(banco$FucnmolmL4),log10(banco$FucnmolmL4),log10(banco$FucnmolmL4))
sobrevida$Shannon <- c((banco$Shannon),(banco$Shannon),(banco$Shannon))
sobrevida$Simpson <- c((banco$Simpson),(banco$Simpson),(banco$Simpson))

sobrevida$FL2_cat <- c((banco$FL2_cat),(banco$FL2_cat),(banco$FL2_cat))
sobrevida$FL3_cat <- c((banco$FL3_cat),(banco$FL3_cat),(banco$FL3_cat))
sobrevida$LNnT_cat <- c((banco$LNnT_cat),(banco$LNnT_cat),(banco$LNnT_cat))
sobrevida$SL3_cat <- c((banco$SL3_cat),(banco$SL3_cat),(banco$SL3_cat))
sobrevida$DFLac_cat <- c((banco$DFLac_cat),(banco$DFLac_cat),(banco$DFLac_cat))
sobrevida$SL6_cat <- c((banco$SL6_cat),(banco$SL6_cat),(banco$SL6_cat))
sobrevida$LNT_cat <- c((banco$LNT_cat),(banco$LNT_cat),(banco$LNT_cat))
sobrevida$LNFI_cat <- c((banco$LNFI_cat),(banco$LNFI_cat),(banco$LNFI_cat))
sobrevida$LNFII_cat <- c((banco$LNFII_cat),(banco$LNFII_cat),(banco$LNFII_cat))
sobrevida$LNFIID_cat <- c((banco$LNFIID_cat),(banco$LNFIID_cat),(banco$LNFIID_cat))
sobrevida$LSTb_cat <- c((banco$LSTb_cat),(banco$LSTb_cat),(banco$LSTb_cat))
sobrevida$LSTc_cat <- c((banco$LSTc_cat),(banco$LSTc_cat),(banco$LSTc_cat))
sobrevida$DFLNT_cat <- c((banco$DFLNT_cat),(banco$DFLNT_cat),(banco$DFLNT_cat))
sobrevida$LNH_cat <- c((banco$LNH_cat),(banco$LNH_cat),(banco$LNH_cat))
sobrevida$DSLNT_cat <- c((banco$DSLNT_cat),(banco$DSLNT_cat),(banco$DSLNT_cat))
sobrevida$FLNH_cat <- c((banco$FLNH_cat),(banco$FLNH_cat),(banco$FLNH_cat))
sobrevida$DFLNH_cat <- c((banco$DFLNH_cat),(banco$DFLNH_cat),(banco$DFLNH_cat))
sobrevida$FDSLNH_cat <- c((banco$FDSLNH_cat),(banco$FDSLNH_cat),(banco$FDSLNH_cat))
sobrevida$DSLNH_cat <- c((banco$DSLNH_cat),(banco$DSLNH_cat),(banco$DSLNH_cat))
sobrevida$SUM_cat <- c((banco$SUM_cat),(banco$SUM_cat),(banco$SUM_cat))
sobrevida$Sia_cat <- c((banco$Sia_cat),(banco$Sia_cat),(banco$Sia_cat))
sobrevida$Fuc_cat <- c((banco$Fuc_cat),(banco$Fuc_cat),(banco$Fuc_cat))
sobrevida$Shannon_cat <- c((banco$Shannon),(banco$Shannon),(banco$Shannon))
sobrevida$Simpson_cat <- c((banco$Simpson),(banco$Simpson),(banco$Simpson))

sobrevida$pn <- c(banco$pn4,banco$pn4,banco$pn4)
sobrevida$imc_pg <- c(banco$cat_bmi_pg2,banco$cat_bmi_pg2,banco$cat_bmi_pg2)
sobrevida$pn_cat <- c(banco$pn4_cat,banco$pn4_cat,banco$pn4_cat)
sobrevida$wg_adqe <- c(banco$adeq_p,banco$adeq_p,banco$adeq_p)
sobrevida$sg_parto <- c(banco$sg_parto,banco$sg_parto,banco$sg_parto)
sobrevida$idade_mae <- c(banco$idade_mae_calc1,banco$idade_mae_calc1,banco$idade_mae_calc1)
sobrevida$idade_mae_terc <- c(banco$mother_age_cat,banco$mother_age_cat,banco$mother_age_cat)
sobrevida$paridade_cat <- c(banco$parity_cat,banco$parity_cat,banco$parity_cat)
sobrevida$consumo_gest <- c(banco$new_kcal_totalgest,banco$new_kcal_totalgest,banco$new_kcal_totalgest)

```

```

sobrevida$consumo_terc <-
c(banco$new_kcal_totalgest_cat,banco$new_kcal_totalgest_cat,banco$new_kcal_totalgest_cat)
sobrevida$af_gest <- c(banco$ativ_fis_gest,banco$ativ_fis_gest,banco$ativ_fis_gest)

sobrevida$Asq_comunic_cat <-
c(banco$asq1_comunic_cat,banco$asq6_comunic_cat,banco$asq_12_comunicPontos7_cat)
sobrevida$Asq_coord_cat <-
c(banco$asq1_coordmot_ampla_cat,banco$asq6_coordmot_ampla_cat,banco$asq_12_coordmot_ampPontos7_cat)
sobrevida$Asq_coordfin_cat <-
c(banco$asq1_coordmot_fina_cat,banco$asq6_coordmot_fina_cat,banco$asq_12_coordmot_finPontos7_cat)
sobrevida$Asq_resproblem_cat <-
c(banco$asq1_resolprob_cat,banco$asq6_resolprob_cat,banco$asq_12_resolprobPontos7_cat)
sobrevida$Asq_pessoc_cat <-
c(banco$asq1_pes_soc_cat,banco$asq6_pes_soc_cat,banco$asq_12_pessoalPontos7_cat)
sobrevida$Asq_2oumais_cat <- c(banco$asq_2oumais_1m,banco$asq_2oumais_6m,banco$asq_2oumais_12m)

sobrevida$Asq_comunic <-
c(banco$asq_1_comunicPontos4,banco$asq_6_comunicPontos6,banco$asq_12_comunicPontos7)
sobrevida$Asq_coord <-
c(banco$asq_1_coordmot_ampPontos4,banco$asq_6_coordmot_ampPontos6,banco$asq_12_coordmot_ampPontos7)
sobrevida$Asq_coordfin <-
c(banco$asq_1_coordmot_finPontos4,banco$asq_6_coordmot_finPontos6,banco$asq_12_coordmot_finPontos7)
sobrevida$Asq_resproblem <-
c(banco$asq_1_resolprobPontos4,banco$asq_6_resolprobPontos6,banco$asq_12_resolprobPontos7)
sobrevida$Asq_pessoc <-
c(banco$asq_1_pessoalPontos4,banco$asq_6_pessoalPontos6,banco$asq_12_pessoalPontos7)

sobrevida$n_evento <- c(rep(1, 74), rep(6,74), rep(12,74))

#Curvas gerais- domínio
Surv(sobrevida$idade_meses,sobrevida$Asq_comunic_cat)
KM <- survfit(Surv(idade_meses,sobrevida$Asq_comunic_cat)~1, data = sobrevida, id=id)
summary(KM)
A=(tidy(KM))
knitr::kable(head(A))

Surv(sobrevida$idade_meses,sobrevida$Asq_coord_cat)
KM2 <- survfit(Surv(idade_meses,Asq_coord_cat)~1, data = sobrevida, id=id)
summary(KM2)
B=(tidy(KM2))
knitr::kable(head(B))

Surv(sobrevida$idade_meses,sobrevida$Asq_coordfin_cat)
KM3 <- survfit(Surv(idade_meses,Asq_coordfin_cat)~1, data = sobrevida, id=id)
summary(KM3)
C=(tidy(KM3))
knitr::kable(head(C))

Surv(sobrevida$idade_meses,sobrevida$Asq_resproblem_cat)
KM4 <- survfit(Surv(idade_meses,Asq_resproblem_cat)~1, data = sobrevida, id=id)
summary(KM4)
D=(tidy(KM4))
knitr::kable(head(D))

Surv(sobrevida$idade_meses,sobrevida$Asq_pessoc_cat)
KM5 <- survfit(Surv(idade_meses,Asq_pessoc_cat)~1, data = sobrevida, id=id)
summary(KM5)
E=(tidy(KM5))
knitr::kable(head(E))

```

```

Surv(sobrevida$idade_meses,sobrevida$Asq_2oumais_cat)
KM6 <- survfit(Surv(idade_meses,Asq_2oumais_cat)~1, data = sobrevida, id=id)
summary(KM6)
Fe=(tidy(KM6))
knitr::kable(head(Fe))

# Graficos usando o ggsurvplot
splots <- list()
splots[[1]] <- ggsurvplot(
  KM,data = sobrevida,
  cumcensor = F,linetype = 1,color="black", conf.int = T,risk.table = F,ylim =c(0.40,1.00),pval = T,
  break.y = 0.1, xlim =c(0,14),break.x = 1.0, title = "A", xlab = "Infant age (months)",
  ylab = "Proportion of infants with adequate development", font.x = c(8, "bold", "black"),
  font.y = c(8, "bold", "black"))

splots[[2]] <- ggsurvplot(KM4,data = sobrevida,
  cumcensor = F,linetype = 1,color="black", conf.int = T,risk.table = F,ylim =c(0.40,1.00),pval = T,
  break.y = 0.1, xlim =c(0,14),break.x = 1.0, title = "D", xlab = "Infant age (months)",
  ylab = "Proportion of infants with adequate development", font.x = c(8, "bold", "black"),
  font.y = c(8, "bold", "black"))

splots[[3]] <-ggsurvplot(KM2,data = sobrevida,
  cumcensor = F,linetype = 1,color="black", conf.int = T,risk.table = F,ylim =c(0.40,1.00),pval = T,
  break.y = 0.1, xlim =c(0,14),break.x = 1.0, title = "B", xlab = "Infant age (months)",
  ylab = "Proportion of infants with adequate development", font.x = c(8, "bold", "black"),
  font.y = c(8, "bold", "black"))

splots[[4]] <-ggsurvplot(KM5,data = sobrevida,
  cumcensor = F,linetype = 1,color="black", conf.int = T,risk.table = F,ylim =c(0.40,1.00),pval = T,
  break.y = 0.1, xlim =c(0,14),break.x = 1.0, title = "E", xlab = "Infant age (months)",
  ylab = "Proportion of infants with adequate development", font.x = c(8, "bold", "black"),
  font.y = c(8, "bold", "black"))

splots[[5]] <- ggsurvplot(KM3,data = sobrevida,
  cumcensor = F,linetype = 1,color="black", conf.int = T,risk.table = F,ylim =c(0.40,1.00),pval = T,
  break.y = 0.1, xlim =c(0,14),break.x = 1.0, title = "C", xlab = "Infant age (months)",
  ylab = "Proportion of infants with adequate development", font.x = c(8, "bold", "black"),
  font.y = c(8, "bold", "black"))

splots[[6]] <- ggsurvplot(KM6,data = sobrevida,
  cumcensor = F,linetype = 1,color="black", conf.int = T,risk.table = F,ylim =c(0.40,1.00),pval = T,
  break.y = 0.1, xlim =c(0,14),break.x = 1.0, title = "F", xlab = "Infant age (months)",
  ylab = "Proportion of infants with adequate development", font.x = c(8, "bold", "black"),
  font.y = c(8, "bold", "black"))

arrange_ggsurvplots(splots, ncol = 3, nrow =2)

```

Tabela 3 – Risco competitivo**Figura 4, 5 e 6****Figuras suplementares 1, 2 e 3****Tabela Suplementar 1 (modelos brutos) e Tabela Suplementar 2 (modelos ajustados)****Tabela Suplementar 3 (modelos brutos) e Tabela Suplementar 4 (modelos ajustados)**

(Anexos online)

FIM