



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP

FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Pediatria

ANGÉLICA CARREIRA DOS SANTOS

**Amamentação, idade gestacional epigenética e seu impacto no
desenvolvimento neuropsicomotor e obesidade aos 36 meses de idade:
uma análise de moderação**

SÃO PAULO

2020

ANGÉLICA CARREIRA DOS SANTOS

**Amamentação, idade gestacional epigenética e seu impacto no
desenvolvimento neuropsicomotor e obesidade aos 36 meses de idade:
uma análise de moderação**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutora em
Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Prof.^a Dra. Alexandra
Valeria Maria Brentani

SÃO PAULO

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Angélica Carreira dos
Amamentação, idade gestacional epigenética e seu
impacto no desenvolvimento neuropsicomotor e
obesidade aos 36 meses de idade : uma análise de
moderação / Angélica Carreira dos Santos. -- São
Paulo, 2020.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.
Orientadora: Alexandra Valeria Maria Brentani.

Descritores: 1. Idade gestacional 2. Epigenômica
3. Desenvolvimento infantil 4. Obesidade pediátrica
5. Aleitamento materno

USP/FM/DBD-259/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos pesquisadores brasileiros, que mesmo em meio
a tantos ataques à educação e falta financiamento,
continuam realizando pesquisas de qualidade.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dra. Alexandra Brentani, que me apoiou, orientou e incentivou nessa jornada. Ela confiou em mim antes mesmo de eu confiar em mim mesma, sem sua ajuda e apoio constante, este projeto não teria se realizado.

De importância imensurável, agradeço aos meus pais, Nanci Carreira e Gilberto Cordeiro dos Santos por terem acreditado no meu sonho mesmo nos momentos mais difíceis. Sem seu amor, compreensão e apoio, nada disso teria sido possível.

Ao meu parceiro de vida, namorado e melhor amigo, Alessandro Bigoni, pelo exemplo de como ser uma pesquisadora melhor, pelos ensinamentos, apoio e paciência. Obrigada por estar sempre caminhando ao meu lado.

À Prof.^a Dra. Helena Brentani e todos os colaboradores desse projeto, em especial a Veronica Luiza Vale Euclides Colovati, pelo processamento das amostras biológicas, ajuda nas análises e interpretação dos dados.

Às famílias que aceitaram doar parte de seu tempo para que este estudo se realizasse. Elas são imprescindíveis para que a ciência de maneira ética e humana seja realizada.

À Prof.^a Dra. Danielle Arisa Caranti que me deu a primeira oportunidade na pesquisa e que com seu apoio, me ajudou a crescer.

Ao Prof.^o Dr. Günther Fink, por sua disponibilidade constante e ensinamentos durante meu período no *Swiss Tropical and Public Health Institute*.

Aos meus amigos, que não citarei nomes por ter a sorte divina de serem tantos, que tiveram paciência, que me apoiaram e compreendiam mesmo com minhas desculpas constantes por estar trabalhando. A eles, meu eterno agradecimento.

E por último, mas não menos importante, aos órgãos financiadores como CAPES, FAPESP e CNPq por todo o apoio financeiro que proporcionou a realização deste projeto.

“To the rebel girls of the world:

Dream bigger

Aim higher

Fight harder

And, when in doubt, remember

You are right”

Elena Favilli, Good Night Stories for Rebel Girls –

Gift Box Set: 100 Tales of Extraordinary Women

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	17
<i>1.1. Desenvolvimento na primeira infância e nutrição</i>	<i>17</i>
<i>1.2. Epigenética.....</i>	<i>20</i>
<i>1.2.1. Metilação do DNA.....</i>	<i>21</i>
<i>1.3. Amamentação e epigenética</i>	<i>23</i>
2. JUSTIFICATIVA	26
3. HIPÓTESES	28
4. OBJETIVOS	29
<i>4.1. Objetivo geral</i>	<i>29</i>
<i>4.2. Objetivos específicos</i>	<i>29</i>
5. MÉTODOS.....	30
<i>5.1. Contexto e delineamento do estudo.....</i>	<i>30</i>
<i>5.2. Critérios para a composição da amostra.....</i>	<i>31</i>
<i>5.3. Aspectos éticos.....</i>	<i>31</i>
<i>5.4. Avaliação no nascimento.....</i>	<i>32</i>
<i>5.4.1. Metilação do DNA e IG epigenética.....</i>	<i>32</i>
<i>5.5. Avaliação aos 3 anos</i>	<i>34</i>
<i>5.5.1. Amamentação.....</i>	<i>36</i>

5.6.	<i>Análises estatísticas</i>	37
5.6.1.	<i>Banco de Dados</i>	37
5.6.2.	<i>Tratamento das variáveis</i>	37
5.6.3.	<i>Imputação Múltipla por Equações em Cadeia (IMEC)</i>	40
5.6.4.	<i>Análise de Moderação</i>	41
6.	RESULTADOS	43
6.1.	<i>Seleção da Amostra</i>	43
6.2.	<i>Características Maternas</i>	44
6.3.	<i>Características da Criança e Idade Gestacional Epigenética</i>	45
6.4.	<i>Análise de Moderação</i>	51
7.	DISCUSSÃO	56
8.	CONCLUSÕES	66
9.	ANEXOS	67
10.	REFERÊNCIAS	80
11.	ATIVIDADES NO EXTERIOR	93
12.	PUBLICAÇÕES	95

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Modelo de moderação entre exposição e desfecho	41
Figura 2	Fluxograma do processo de seleção da amostra	43
Figura 3	Coefficiente de correlação de Pearson entre idade gestacional cronológica e idade gestacional epigenética estratificadas por sexo	46
Figura 4	Associação entre aceleração da idade epigenética e peso ao nascer, escore-z comprimento-para-idade, perímetro torácico e Box-plot da distribuição da aceleração da idade gestacional de acordo com a classificação de idade gestacional cronológica	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Teste-t avaliando a diferença entre a população perdida e acompanhada entre o nascimento e 3 anos na subamostra da coorte ROC	44
Tabela 2	Características maternas e sua associação com a idade gestacional epigenética e aceleração da idade gestacional do neonato	45
Tabela 3	Características do neonato	47
Tabela 4	Associação entre as características do neonato e a idade gestacional epigenética e aceleração da idade epigenética	48
Tabela 5	Características da criança no acompanhamento de 3 anos	42
Tabela 6	Associação entre as características da criança no acompanhamento e idade gestacional epigenética e aceleração da idade epigenética	50
Tabela 7	Médias e desvio padrão das variáveis independentes e moderadoras	51
Tabela 8	Regressão por blocos para avaliar a interação entre a amamentação exclusiva e total com a idade gestacional epigenética e aceleração da idade gestacional nos desfechos PRIDI e Obesidade aos 3 anos	54

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

γ	Gama
\pm	Mais ou menos
<	Menor
%	Porcentagem
ACC	Análise de Casos Completos
ACP	Análise de Componentes Principais
ACPICL	Ácidos Graxos Poli-insaturados de Cadeia Longa
AIG	Aceleração da Idade Epigenética
AM	Amamentação total
AME	Amamentação Exclusiva
APGAR	Aparência, Pulso, Gesticulação, Atividade, Respiração
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CAP	Comitê de Ética e Pesquisa
Cm	Centímetros
CP	Componentes Principais
CpG	Citosina-fosfato-Guanina
DHA	<i>Docosahexaenoic acid</i> – Ácido Docosaexaenoico
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido Desoxirribonucleico
DOHaD	<i>Developmental Origins of Health nad Disease</i> – Origem Desenvolvimentista da Saúde e Doença
DP	Desvio Padrão

DPI	Desenvolvimento na Primeira Infância
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> – Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAD2	<i>Fatty acid desaturase 2</i> – Desaturase 2 de ácidos graxos
FMI	<i>Fraction of Missing Information</i> – Fração de dados faltantes
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HOME	<i>Home Observation for Measurement of the Environment</i>
HU-USP	Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
IC	Intervalo de Confiança
IG	Idade Gestacional
IGE	Idade Gestacional Epigenética
IM	Imputação Múltipla
IMC	Índice de Massa Corporal
IMEC	Imputação Múltipla por Equações em Cadeia
Kg	Quilogramas
LIM	Laboratório de Psicopatologia e Terapêutica Psiquiátrica
m ²	Metros quadrados
N	Tamanho da amostra
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMRs	Países de Baixa e Média Renda
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia Polimerase
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> – Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissoma
PRIDI	Projeto Regional sobre os Indicadores de Desenvolvimento na Infância
Pro12Ala	substituição de uma alanina por prolina na posição 12

PSF	Programa Saúde da Família
QI	Quociente de Inteligência
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – Ácido Ribonucleico
ROC	Coorte Região Oeste
RVI	<i>Relative Variance Increase</i> – Aumento Relativo da Variância
SES	Status Socioeconômico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

RESUMO

Santos AC. *Amamentação, idade gestacional epigenética e seu impacto no desenvolvimento neuropsicomotor e obesidade aos 36 meses de idade: uma análise de moderação* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: A hipótese das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença (DOHaD) sugere que durante períodos sensíveis e de alta plasticidade, como o período intrauterino, as adversidades sofridas podem modular o epigenoma do indivíduo com consequências de curto e longo prazo para a saúde. Estudos apontam que mesmo pequenas diferenças na Idade Gestacional (IG), podem impactar a saúde neonatal e desfechos de saúde, além de ter sido associada a diferenças na metilação do DNA em sítios CpGs específicos. Essas associações apontam para a possível relação entre IG e exposições adversas sofridas *in útero*. Embora as evidências sobre os mecanismos epigenéticos ainda não sejam conclusivas em relação à associação entre a amamentação e desenvolvimento e obesidade, os estudos epidemiológicos comprovam os efeitos positivos do aleitamento materno. **Objetivos:** Identificar associações entre a IG epigenética, o desenvolvimento infantil e obesidade aos 3 anos de idade, moderadas pela amamentação. **Métodos:** Foram recrutadas 96 gestantes como subamostra da Coorte Região Oeste (ROC). O sangue do cordão umbilical foi coletado no momento do parto seguindo protocolos padronizados. Os dados hospitalares referentes ao nascimento e características do neonato foram extraídos do sistema eletrônico de informação de pacientes do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. As análises de metilação do DNA do sangue do cordão umbilical foram realizadas utilizando a plataforma *Illumina HumanMethylation450 (450k) BeadChips* seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. A IG epigenética foi calculada com base na metilação do DNA de 143 sítios CpGs segundo o método de Knight. Dados referentes ao desenvolvimento físico e neuropsicomotor aos 3 anos de idade foram coletados durante visita domiciliar realizada por entrevistadores treinados. Para avaliar as associações, utilizamos modelos de regressão linear e imputação múltipla de dados para lidar com os dados faltantes. **Resultados:** No nascimento, a

aceleração da IG foi associada com a redução de 0,30 cm no perímetro torácico (95%IC: -0,57; -0,03) e aumento de 0,42 DP no escore-z de comprimento-ajustado para-idade (95%IC: 0,03; 0,81). O peso ao nascer teve uma modesta associação inversa com aceleração da IG (β : -0,001; 95%IC: -0,000; -0,000). Crianças nascidas pré-termo de acordo com a classificação da IG cronológica, tiveram uma aceleração da IG 2,6 semanas maior quando comparadas às crianças nascidas de termo (95%IC: 0,60-4,54). Não foram encontradas associações entre IG epigenética e desenvolvimento neuropsicomotor ou obesidade aos 3 anos de idade, nem mesmo quando a amamentação foi inserida como fator moderador.

Conclusão: Este estudo fornece evidências de que a aceleração da IG está associada à ocorrência de prematuridade e características antropométricas do neonato. No entanto, a associação com o desenvolvimento infantil ou a obesidade aos 3 anos não é estatisticamente significativa. Estudos com amostras maiores, são necessários para entendermos os fatores por trás do relógio epigenético e sua associação com os desfechos ao nascer, desenvolvimento neuropsicomotor e físico das crianças na população brasileira.

Descritores: Idade gestacional; Epigenômica; Desenvolvimento infantil; Obesidade pediátrica; Aleitamento materno.

ABSTRACT

Santos AC. *Breastfeeding, epigenetic gestational age and its impact on neuropsychomotor development and obesity at 36 months of age: a moderation analysis* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Background: The hypothesis of the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) suggests that during sensitive and highly plastic periods, such as the intrauterine period, the adversities suffered can modulate the individual's epigenome, with short and long-term health consequences. Studies show that even small Gestational Age (GA) differences can impact neonatal health and future health outcomes. It is also associated with differences in DNA methylation at specific CpGs sites. These associations might be due to the possible relationship between GA and the adverse exposures suffered intra utero. Although the evidence on epigenetic mechanisms concerning the association between breastfeeding and child development and obesity, is not conclusive, epidemiological studies have shown the positive effects of breastfeeding on child's health. **Objectives:** To identify associations between epigenetic GA and child development and obesity at 3 years of age, moderated by breastfeeding. **Methods:** 96 pregnant women were recruited as a subsample of the Western Region Cohort (ROC). Umbilical cord blood was collected at the time of delivery according to standardized protocols. Hospital data regarding birth and newborns characteristics were extracted from the electronic patient registry information system at the University Hospital of the University of São Paulo. The cord blood DNA methylation analyzes were performed using the Illumina HumanMethylation450 (450k) BeadChips platform, according to the manufacturer's protocol. Epigenetic GA was calculated based on DNA methylation of 143 CpGs sites using the Knight method. Data on physical and neurocognitive development at 3 years of age were collected during home visits performed by trained interviewers. We used linear regression models to evaluate the associations. Multiple imputations were applied to deal with the missing data. **Results:** At birth, GA acceleration was associated with a 0.30 cm reduction in the thoracic circumference (95% CI:

-0.57; -0.03) and an increase of 0.42 SD z-score of length-for-age (95% CI: 0.03; 0.81). Birth weight had a modest inverse association with GA acceleration (β : -0.001; 95% CI: -0,000; -0,000). According to the chronological GA classification, preterm children had an acceleration of GA 2.6 weeks higher when compared to full term children (95% CI: 0.60-4.54). No associations were found between epigenetic GA and child development and obesity at 3 years of age, when breastfeeding was used as a moderating factor. **Conclusion:** This study provides evidence that the acceleration of GA is associated with premature births and anthropometric characteristics of the newborn and that the association with child development or obesity at 3 years is not statistically significant. Larger studies are needed to understand the factors behind the epigenetic clock and its association with outcomes at birth, neurocognitive, and physical development of children in the Brazilian population.

Descriptors: Gestational age; Epigenomics; Child development; Pediatric obesity; Breast feeding.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Desenvolvimento na primeira infância e nutrição

Promover um desenvolvimento adequado nos primeiros anos de vida é de extrema importância para uma vida saudável e uma sociedade menos desigual¹. Embora o Desenvolvimento na Primeira Infância (DPI) – período entre o nascimento e os 6 anos de vida - tenha melhorado nos últimos anos, estima-se que mais de 250 milhões de crianças menores de cinco anos nos Países de Baixa e Média Renda (PBMRs) ainda estejam em risco de não atingir seu potencial de desenvolvimento². Só no Brasil, cerca de 5,4 milhões (29%) das crianças até os 6 anos ainda vivem na pobreza, considerada como um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento inadequado na infância³. Apesar de as condições de vida terem melhorado, o Brasil ainda é um dos países mais desiguais do mundo⁴, de forma que uma grande parcela da população encontra-se exposta a fatores negativos para o desenvolvimento como nutrição materna inadequada durante a gestação, curtos períodos de amamentação exclusiva, desnutrição infantil, falta de estímulos e negligência durante a infância^{2,5-8}.

Iniciando no período pré-natal, continuando pela infância e estendendo-se pela vida, o desenvolvimento se dá pela interação contínua entre fatores biológicos (como a genética) e ambientais (como sociais e nutricionais)⁹. Durante os primeiros anos o cérebro se

desenvolve mais rapidamente do que em qualquer outro momento da vida e as interações entre os genes e o ambiente a qual a criança está exposta, moldam os circuitos cerebrais em desenvolvimento⁹⁻¹¹. Com base na hipótese das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHaD, sigla em inglês), estudos epidemiológicos demonstraram que as adversidades sofridas durante a gestação e primeiros 2 anos de vida (primeiros 1.000 dias), afetam a saúde física e mental da criança, influenciando desde a sua longevidade até a capacidade de aprender e se adaptar às circunstâncias adversas, aumentando sua suscetibilidade às doenças crônicas durante toda a vida^{9,10,12,13}.

As crianças sob o risco de não atingirem seu potencial de desenvolvimento são principalmente aquelas que vivem sob extrema pobreza ou desnutrição². No Brasil, o perfil nutricional das crianças foi de um extremo ao outro nas últimas décadas. A prevalência de déficit de crescimento (escore-z de estatura-para-idade < 2 nas curvas de crescimento da Organização Mundial da Saúde [OMS]¹⁴) diminuiu substancialmente desde a década de 1970, passando de cerca de 37% em 1974-75 para 7,1% em 2006-7¹⁵. O baixo peso para a idade (escore-z de peso-para-idade < 2 nas curvas de crescimento da OMS¹⁴) também foi outro indicador que melhorou, passando de 5,6% em 1989 para 2,2% em 2006-07¹⁵. Em contrapartida, o sobrepeso e a obesidade que antes eram considerados um problema de países desenvolvidos, vêm aumentando nos PBMRs, particularmente em áreas urbanas¹⁶. Estima-se que mais de 7% das crianças brasileiras menores de 5 anos estejam com sobrepeso ou obesas¹⁷, o que pode prejudicar a saúde e o desenvolvimento das crianças a curto e longo prazo^{12,18}. Embora a adequação nutricional seja necessária para prevenir e tratar a obesidade, outros fatores também contribuem para o ganho de peso e desenvolvimento saudáveis das crianças¹⁹.

Interação e a responsividade dos pais beneficiam não apenas o comportamento alimentar, mas também contribuem para o neurodesenvolvimento saudável da criança¹⁹. A curto prazo, a alimentação responsiva aumenta a atenção da criança aos sinais internos de fome e saciedade e, a longo prazo, melhora sua competência psicossocial, cognitiva e de linguagem, além de nutrição e crescimento saudáveis¹⁹. A amamentação tem um papel essencial na responsividade materna e na saúde da criança, à medida que as mães aprendem a interpretar os sinais de fome e saciedade do filho, também ajuda a criança melhorar seu desenvolvimento cognitivo e emocional^{10,19}. Além disso, estudos demonstraram que o aleitamento materno reduz mortes neonatais e melhora o sistema imunológico infantil^{20,21}. Amamentação prolongada também pode aumentar o desempenho em testes de inteligência, escolaridade e renda^{21,22}, além de reduzir a prevalência de sobrepeso e obesidade em cerca de 10% na população²³.

Embora os benefícios da amamentação para a díade mãe-lactente sejam bem estabelecidos e a amamentação exclusiva seja amplamente recomendada pelos órgãos de saúde como Ministério da Saúde²⁴ e OMS^{20,23}, as taxas de amamentação ainda estão longe do ideal²⁵. As evidências dos benefícios da amamentação a curto prazo são principalmente relacionados à composição nutricional do leite materno, particularmente protegendo contra infecções^{21,26}. Os mecanismos que permeiam os efeitos de longo prazo, por outro lado, ainda não foram completamente esclarecidos, mas evidências sugerem que a amamentação pode influenciar o perfil epigenético da criança por meio de sua composição ou mediado pela microbiota, que está relacionada à alimentação no início da vida^{23,27-31}.

1.2. Epigenética

O Ácido Desoxirribonucleico (DNA, sigla em inglês) é formado por uma dupla hélice construída a partir de quatro nucleotídeos: citosina, timina, guanina e adenina. A sequência específica de cada região coordena o desenvolvimento e funcionamento do organismo, codificando genes para a produção de proteínas específicas. O DNA é a parte estrutural do genoma, sendo basicamente o mesmo em todas as células e relativamente estável durante toda a vida. No entanto, apesar de todas as células possuírem o mesmo DNA, elas formam diferentes órgãos, cada um com tarefas e funções específicas em nosso corpo. Conrad Waddington em 1942, antes mesmo da descoberta da dupla hélice do DNA, cunhou o termo “epigenética” (do grego *epigenesis*) para denotar as ações dinâmicas que levam do genótipo ao fenótipo³². Atualmente, o termo epigenética refere-se ao estudo de alterações hereditárias mitoticamente e/ou meioticamente na regulação da expressão gênica sem alteração na sequência de nucleotídeos do DNA³³.

Esses mecanismos são fundamentais para o garantir pleno desenvolvimento do indivíduo, permitindo que o ambiente interaja com os genes “ligando-os e desligando-os”, regulando assim, o fenótipo. Durante o desenvolvimento fetal e primeiros anos de vida, a taxa de divisão celular é dramaticamente aumentada e o DNA mais exposto às modificações químicas³⁴. Por esse motivo, a célula possui maior plasticidade e é mais vulnerável a alterações epigenéticas. Os mecanismos epigenéticos mais estudados atualmente são a metilação do DNA, acetilação de histonas e ação do Ácido Ribonucleico (RNA, sigla em inglês) não-codificantes. Em nosso estudo, focaremos na metilação do DNA, que é umas das

reações químicas que ocorrem mais frequentemente nos eucariotos além de ser a marca epigenética mais estudada e bem caracterizada até o momento.

1.2.1. Metilação do DNA

O processo de metilação envolve a adição de um radical metil (-CH₃) a base citosina que é seguida por uma base guanina, esses locais são conhecidos como sítios CpG (Citosina-fosfato-Guanina)³⁵. Esse processo se dá por uma ligação covalente, o que a torna relativamente estável ao longo da vida, permitindo que o perfil de metilação (metiloma) estabelecido durante o período de maior plasticidade seja mantido^{36,37}. Contudo, à medida que as células se diferenciam, alguns sítios CpGs estão sujeitos à hipermetilação relacionada à idade^{38,39}. Isso ocorre principalmente em ilhas CpG⁴⁰, em domínios de cromatina bivalente que estão associados a genes chave para o desenvolvimento⁴¹ e em proteínas do grupo Polycomb⁴².

Esse processo têm sido estudado em diversos tecidos e recentemente Horvath (2013)⁴³ desenvolveu um modelo para estimar a idade biológica (idade epigenética) utilizando a metilação do DNA em 353 sítios CpGs, distribuídos pelo genoma de 51 tecidos diferentes. Embora o epigenoma - que consiste em compostos químicos que modificam, ou marcam, o genoma de uma maneira que diz o que fazer, onde fazer e quando fazer - seja altamente específico nos diferentes tecidos, a correlação entre idade cronológica e biológica foi de 96% ($r = 0,96$), com variação de em média 3 anos entre a idade cronológica e biológica⁴³. A diferença entre idade cronológica e idade epigenética é definida como

aceleração da idade epigenética e estudos têm mostrado sua associação com mortalidade por todas as causas⁴⁴⁻⁴⁶, menopausa⁴⁷, menor função física e cognitiva⁴⁸, Alzheimer⁴⁹ e obesidade^{50,51}.

A hipótese da DOHaD sugere que durante períodos sensíveis e de alta plasticidade, como o período intrauterino, as adversidades sofridas podem modular o epigenoma do indivíduo gerando consequências imediatas como baixo peso ao nascer^{12,52-55} e também consequências a longo prazo para a saúde^{54,56,57}. Estudos apontam que mesmo pequenas diferenças na Idade Gestacional (IG), pode impactar significativamente a morbidade e mortalidade neonatal e em desfechos de saúde a longo prazo⁵⁸⁻⁶¹. A IG também tem sido associada a diferenças na metilação do DNA em sítios CpGs específicos, o que aponta para a possível relação entre IG e exposições sofridas *in utero*⁶²⁻⁶⁴. Embora o modelo de Horvath (2013)⁴³ tenha se mostrado acurado para estimar a idade em adultos, ele não foi desenvolvido para estimar a IG em neonatos. Baseado nesse modelo, Knight et al. (2016)⁶⁵ utilizaram dados de metilação do DNA de sangue do cordão umbilical de 15 coortes de diferentes ancestralidades para estimar a IG epigenética. O modelo final se baseia na metilação do DNA de 143 sítios CpGs uniformemente distribuídos pelo genoma, obtendo alta correlação com a IG cronológica.

Estudos baseados nesse modelo mostram que a aceleração da IG (diferença entre IG cronológica e epigenética) está associado à exposição a diversos fatores durante a gestação como baixo Status Socioeconômico (SES), idade materna, pré-eclâmpsia, diabetes gestacional e com desfechos ao nascer como baixo peso, baixo APGAR score (Aparência, Pulso, Gesticulação, Atividade, Respiração) no 1 minuto e prematuridade⁶⁵⁻⁶⁷. A IG epigenética também foi associada com desfechos durante a infância e adolescência⁶⁷⁻⁶⁹. O

estudo de Suarez et al. (2018)⁶⁷ evidenciou que depressão pré-natal materna estava associada à IG epigenética, por sua vez associada a uma desvantagem no desenvolvimento de meninos. Além disso, também há evidências de que a IG epigenética se associe com o crescimento estato-ponderal da criança^{68,69}. Portanto, a IG epigenética pode ser um potencial biomarcador das adversidades ou stress tóxico sofrido no período intrauterino, fortemente correlacionada a desfechos futuros. Dessa forma, a IG pode ser utilizada quando outros parâmetros não estiverem disponíveis.

Apesar de o perfil de metilação ser relativamente estável, ele se altera com o decorrer do tempo³⁹. O fato das marcas epigenéticas não serem fixas ao longo do tempo abre um leque de possibilidades para o estudo tanto das causas como os efeitos das modificações epigenéticas.

1.3. Amamentação e epigenética

A amamentação está associada não apenas com melhores parâmetros de crescimento e desenvolvimento, mas também com a prevenção de algumas doenças crônicas não-transmissíveis^{23,30,31}. Evidências sugerem que amamentação pode influenciar a metilação do DNA através de seus componentes nutricionais²⁹, mas como apontado pela revisão sistemática realizada por Hartwig et al. (2017)⁷⁰, os resultados estão longe de serem conclusivos.

Um estudo recente fornece evidências sobre a magnitude e persistência da associação entre amamentação e metilação do DNA⁷¹. Os achados dos autores sugerem que a amamentação estava associada às alterações no perfil da metilação do DNA de indivíduos aos 7 e 15-17 anos de idade⁷¹. O estudo realizado por Obermann-Borst et al. (2013)²⁸ avaliou 120 pares de mães-lactentes e seus resultados apontaram para uma correlação inversa entre a duração da amamentação e a metilação do gene que codifica a leptina. Mais recentemente, Sherwood et al. (2019)⁷² também encontrou associação entre a duração da amamentação e a metilação da leptina aos 10 anos de idade e também às trajetórias do Índice de Massa Corporal (IMC). A leptina é um hormônio relacionado à saciedade e pode ser um dos mecanismos plausíveis para explicar a relação inversa entre amamentação e obesidade²³.

De fato, a nutrição nos primeiros anos é um dos fatores mais importantes no contexto da DOHaD para o desenvolvimento de doenças⁷³⁻⁷⁵. O leite materno é rico em Ácidos Graxos Poli-insaturados de Cadeia Longa (ACPICL), conhecidos por seus efeitos no crescimento e desenvolvimento. Estão também associados a efeitos protetivos, como o menor risco de síndrome metabólica e doenças cardiovasculares⁷⁶. O Ácido Docosaenoico (DHA, sigla em inglês) em especial, é reconhecido por seus efeitos benéficos sobre a neurotransmissão, neurodesenvolvimento e acuidade visual⁷⁷⁻⁸². O DHA também pode estar envolvido na ativação do fator de transcrição dos Receptores Ativado por Proliferador de Peroxissoma (PPAR, sigla em inglês) que são principalmente expressos nos adipócitos, influenciando a homeostase energética através da diferenciação de adipócitos, sensibilidade à insulina e metabolismo de lipoproteínas⁸³. Os ACPICL são biologicamente ativos e ricos em fosfolipídios que estão entre os principais aceptores de grupos metil podendo estar envolvidos em reações de metilação do DNA⁸⁴.

Estudos também sugerem que a interação entre gene e ambiente pode ser a chave na associação entre a amamentação e desenvolvimento neurocognitivo e obesidade. O estudo de Caspi et al. (2007)⁸⁵ demonstrou que a associação entre amamentação e Quociente de Inteligência (QI) era moderada por uma variante genética na Desaturase 2 de ácidos graxos (FADS2, sigla em inglês), gene envolvido nas vias de ácidos graxos. O estudo de Colin et al. (2010)⁸⁶ por outro lado, apesar de não replicar os achados de Caspi et al. (2007)⁸⁵, encontrou que as crianças amamentadas tiveram um desempenho semelhante independente do polimorfismo. Contudo, aquelas alimentadas com fórmula que tinham o polimorfismo tiveram um desempenho pior do que outras crianças sem polimorfismo, alimentadas com fórmula. Já o polimorfismo Pro12Ala (substituição de uma alanina por prolina na posição 12) no gene PPAR γ foi associado a maiores taxas de crescimento entre nascimento e 18 meses em crianças não amamentadas ou amamentadas por menos de 4 meses, enquanto crianças amamentadas por mais de 4 meses não tiveram diferença nas taxas de crescimento⁸⁷. Semelhantemente, Verier et al. (2010)⁸⁸ observou que esse mesmo polimorfismo estava associado a índices de adiposidade mais elevados (IMC, circunferência da cintura e a soma das dobras cutâneas) em adolescentes que não haviam sido amamentados.

Os estudos apresentados acima, trazem discussões dos possíveis mecanismos pelo qual a amamentação atua no epigenoma. Eles apontam que a amamentação é um fator mais importante que o polimorfismo em si, já que indivíduos com e sem polimorfismos obtiveram resultados semelhantes quando amamentados.

2. JUSTIFICATIVA

Como expostos nas sessões anteriores, o processo de desenvolvimento é dinâmico e pautado por interações entre os genes e o ambiente, mediado por uma série de modificações epigenéticas, afetando a fisiologia, crescimento e o comportamento da criança em desenvolvimento¹¹. Embora as evidências sobre os mecanismos epigenéticos ainda não sejam conclusivas em relação à associação entre a amamentação, desenvolvimento e obesidade, os estudos epidemiológicos comprovam efeitos positivos do aleitamento materno nos desfechos de curto e longo prazo^{21,89}.

Como dito anteriormente, a IG epigenética pode ser um potencial biomarcador do estresse sofrido no período pré-natal, assim como um preditor de desfechos futuros. Em virtude da limitação de estudos disponíveis, não temos conhecimento de nenhum estudo anterior que tenha testado a relação entre a IG epigenética estimada com base na metilação do DNA do sangue do cordão umbilical e sua interação com a amamentação nos desfechos de desenvolvimento infantil e obesidade na infância. O estudo de Simpkin et al. (2016)⁹⁰ foi o único, no nosso conhecimento, a investigar a potencial associação entre amamentação (sim/não) e idade epigenética na infância e na adolescência, mas não a IG epigenética e seu impacto em desfechos posteriores. Os autores desse estudo não encontraram nenhuma associação em nenhuma das idades avaliadas.

A detecção precoce da exposição ao estresse durante a gestação e demais fatores ambientais capazes de moderar e contrabalancear seus efeitos negativos, pode ser uma ferramenta importante para melhorar a saúde e o bem-estar das crianças, levando-as a uma

vida adulta mais saudável. Tendo em vista a dificuldade de avaliar o estresse sofrido durante a gestação, que se baseia em recordatórios reportados, sujeitos aos vieses de uma entrevista, pretendemos utilizar a IG epigenética estimada a partir da metilação do DNA do sangue do cordão umbilical⁶⁵ como marcador do estresse sofrido durante a gestação e verificar sua associação com o desenvolvimento e obesidade infantil. Além disso, iremos avaliar a possível interação entre a IG epigenética e a amamentação, e seus impactos no desenvolvimento aos 3 anos. Desta maneira, consideramos este estudo inédito, que poderá trazer avanços ao conhecimento sobre o tema proposto.

3. HIPÓTESES

- a) A IG epigenética e a aceleração da IG podem ser utilizadas como biomarcadores de estresse tóxico e exposição à adversidade durante a gestação, estando associadas às condições de nascimento da criança;
- b) A IG e aceleração da IG estão associadas ao desenvolvimento infantil e obesidade aos 3 anos;
- c) A amamentação interage com a IG epigenética e aceleração da IG, atuando como moderador do desenvolvimento infantil e obesidade aos 3 anos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo identificar associações entre a IG epigenética estimada através da metilação do DNA do cordão umbilical, amamentação e desenvolvimento infantil e obesidade aos 3 anos de idade.

4.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar as associações entre IG epigenética/aceleração da IG e condições de nascimento;
- b) Avaliar as associações entre a IG epigenética /aceleração da IG e desenvolvimento infantil e obesidade aos 3 anos;
- c) Testar as interações entre a IG epigenética/aceleração da IG e amamentação no desenvolvimento infantil e obesidade aos 3 anos.

5. MÉTODOS

5.1. Contexto e delineamento do estudo

A Coorte Região Oeste (ROC) é uma coorte de nascimentos prospectiva fechada e seus participantes foram selecionados ao nascer no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP)⁹¹. A coorte segue em andamento e todos os detalhes e protocolos podem ser encontrados no perfil da coorte publicado por Brentani et al. (2020)⁹¹.

A Coorte ROC⁹¹ recrutou todas as 6.207 crianças nascidas no HU-USP, residentes da região Oeste de São Paulo entre abril de 2012 e março de 2014. Na ocasião do parto, foram aleatoriamente selecionadas 96 crianças para coleta de material biológico, como sangue da mãe, sangue do neonato, amostra de placenta e sangue do cordão umbilical. O material foi então utilizado para a análise de metilação do DNA. Dados de nascimento foram extraídos do sistema eletrônico de informações do paciente HU-USP. Durante o período de internação pós-parto, entrevistadores treinados coletaram informações adicionais sobre a gestação, dados socioeconômicos e saúde materna. Os dados referentes aos 3 anos de idade foram coletados durante visita domiciliar. Nesta ocasião foram colhidos dados antropométricos, socioeconômicos, de estilo parental, estresse, de amamentação e foram aplicados instrumentos para a avaliação global do desenvolvimento infantil.

5.2. Critérios para a composição da amostra

Foram incluídos no presente estudo todos os nascimentos não gemelares de parturientes que aceitaram participar da Coorte ROC e que tiveram material biológico coletado durante o parto e análise de metilação do DNA realizada, e que posteriormente receberam visita de acompanhamento aos 3 anos de idade, com a devida assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5.3. Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob o número de Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE): 79776417.0.0000.0065 e utiliza dados previamente coletados nos projetos de pesquisas intitulados “*Avaliação do Impacto do Programa de Saúde da Família (PSF) no desenvolvimento da criança*”, sob o CAAE: 01604312.1.0000.0065, e “*Estudo molecular da modulação epigenética em sangue de cordão umbilical e suas relações com antecedentes familiares e condições de nascimento*”, CAAE: 0104.0.198.000-10.

5.4. Avaliação no nascimento

Todos os dados hospitalares referentes ao nascimento e neonato foram extraídos do sistema eletrônico de informação de pacientes do HU-USP. O HU-USP possui como protocolo padrão a avaliação no momento do nascimento de APGAR, sexo, peso, comprimento, perímetro torácico e cefálico e IG. Além dos dados do neonato, coleta-se também dados referentes a raça, data de nascimento e escolaridade materna.

5.4.1. Metilação do DNA e IG epigenética

No momento do parto após assepsia com etanol 70%, foram coletados 50 ml de sangue através de punção venosa do cordão umbilical na parte proximal ao recém-nascido em 10 tubos *Vacutainer* de 5 ml contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) no Centro Obstétrico do HU-USP. As amostras foram armazenadas em geladeira até seu transporte para o Laboratório de Psicopatologia e Terapêutica Psiquiátrica (LIM) 23 do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), onde foram armazenadas e processadas como descrito anteriormente por Maschietto et al. (2017)⁹².

O kit de extração QIAamp DNA BloodMidi Kit (QIAGEN) foi utilizado para a extração do DNA nas amostras de sangue do cordão umbilical seguindo protocolo fornecido pelo fabricante. Utilizando 2µl de cada amostra, foi realizada análise de pureza e

quantificação do DNA por espectrofotometria (*NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA*). O material foi estocado a -80°C no LIM 23 até ser transportado para empresa Deoxi Biotecnologia LTDA (www.deoxi.com.br), onde as análises de metilação ocorreram.

De cada uma das 96 amostras de sangue do cordão umbilical, 500ng de DNA foram extraídos e convertidos com Bissulfito de Sódio (*EZ DNA Methylation-Gold™ Kit, Zymo*). Este processo converte as bases citosina que não estão metiladas em uracila e mantém as bases metiladas como citosina. Após a conversão, o DNA foi processado e amplificado em uma Reação em Cadeia Polimerase (PCR) isotérmica e após amplificação, passou por hidrólise enzimática para evitar fragmentação em excesso. Posteriormente, o DNA fragmentado foi ressuspensão para hibridização.

A hibridização foi realizada utilizando o ensaio *Human Methylation 450 BeadChip microarrays (HM450K, Illumina Inc.)* de acordo com as instruções do fabricante. As lâminas dos ensaios foram inseridas no *iScan SQ scanner (Illumina Inc.)* com o software *GenomeStudio (v.2011.1)*, usando o módulo de metilação v.1.9.0 (*Illumina Inc.*), onde arquivos IDAT foram gerados com os dados brutos. O scanner registra imagens de alta resolução da luz emitida pelos fluoróscoros (verde para metilado e vermelho para não-metilado), e de acordo com sua intensidade é possível calcular a metilação dessas sondas.

Todas as amostras passaram por etapas de controle de qualidade. Os arquivos de dados brutos foram normalizados usando *FunNorm*⁹³ e corrigidos para a composição celular usando um conjunto de dados de sangue do cordão umbilical⁹⁴, conforme implementado no *minfi*⁹⁵. A plataforma HM450K examina os níveis de metilação do DNA de 485.577 loci distribuídos pelo genoma. As sondas foram anotadas de acordo com seus genes mais próximos usando o pacote *FDb.InfiniumMethylation.hg19*. Os níveis de metilação de cada

sonda é dado em valores beta onde 0 indica CpGs não-metilados, e 1 completamente metilado.

Após a análise da metilação do DNA, a IG epigenética foi calculada utilizando o método publicado por Knight et al. (2016)⁶⁵. O cálculo baseia-se no perfil de metilação de 148 sítios CpGs uniformemente distribuídos pelo genoma selecionados através regressão elástica em conjuntos de dados de treinamento. Após o cálculo da IG epigenética, a diferença entre a IG cronológica e IG epigenética (IG cronológica-IG epigenética) também foi calculada. Essa diferença pode ser descrita como aceleração da IG^{38,65}.

Todas as análises foram realizadas no ambiente R versão 3.6.3⁹⁶ utilizando pacotes Bioconductor (bioconductor.org). As IG epigenética e aceleração da IG serão utilizadas neste estudo como exposição e analisadas separadamente.

5.5. Avaliação aos 3 anos

O questionário de acompanhamento dos 3 anos da Coorte ROC foi aplicado por meio de visitas domiciliares onde informações referentes ao desenvolvimento infantil e estado nutricional da criança foram coletadas. O questionário era composto por blocos relativos às informações sobre dados sociodemográficos, estresse parental, insegurança alimentar, suporte social do cuidador, indicadores de desenvolvimento infantil e comportamento da criança, inquérito sobre qualidade do ambiente doméstico, entre outros.

Para avaliar o desenvolvimento infantil, utilizamos a Escala Engle⁹⁷ desenvolvida pelo Projeto Regional sobre os Indicadores de Desenvolvimento na Infância (PRIDI). A

Escala Engle é uma ferramenta de avaliação direta do DPI em crianças com idade entre 24 a 59 meses e visa capturar quatro domínios do DPI:

- **Cognição:** Refere-se à capacidade de receber, processar e organizar informações para resolver problemas, prestar atenção, avaliar e se adaptar às mudanças no ambiente, sendo esse domínio a base da inteligência^{98,99};
- **Linguagem e comunicação:** Refere-se a linguagem expressiva (ex. vocabulário e comunicação não verbal) e receptiva (ex. compreensão de perguntas e pedidos), este domínio está relacionado com a interação social que é preditora do aprendizado escolar^{97,99};
- **Socioemocional:** Compreende experiência, expressão e gerenciamento de emoções da criança e a capacidade de estabelecer relacionamentos positivos e gratificantes com os outros¹⁰⁰;
- **Motor:** Abrange o desenvolvimento motor fino (ex. movimento de pinça) e grosso (ex. sustentação da cabeça, sentar, andar), incluindo coordenação motora^{97,101}.

A Escala Engle é composta por 21 itens distribuídos entre os domínios, cada item é pontuado e a soma de todos os itens varia de 0 a 61 pontos. Pontuações mais altas correspondem a um melhor grau de desenvolvimento infantil.

O segundo desfecho de interesse deste estudo foi obesidade infantil avaliada por meio do índice *score-z* peso-para-estatura aos 36 meses. Esse índice expressa a harmonia entre o ganho de peso e estatura, corrigida para o sexo da criança. Todas as crianças que estavam acima do percentil 95 (*score-z* > 1,65) de peso-para-estatura nas curvas de crescimento da

OMS¹⁴ foram classificadas como obesas. O peso e a estatura da criança foram mensurados por profissionais treinados durante a visita domiciliar com equipamentos padronizados.

5.5.1. Amamentação

A duração da AME e amamentação total (AM) foram reportadas pela mãe ou cuidador durante visita domiciliar aos 3 anos. As informações sobre amamentação foram obtidas em meses através de duas questões “*Por quantos meses a criança recebeu exclusivamente leite materno?*” e “*Por quantos meses a criança recebeu leite materno no total?*”. Como qualquer informação coletada retrospectivamente, o relato do tempo de amamentação pode estar sujeito ao viés de memória e aceitação social. No entanto, os recordatórios sobre a duração da amamentação, mesmo após algum tempo, têm se mostrado confiáveis^{102,103}.

5.6. Análises estatísticas

5.6.1. Banco de Dados

O banco de dados desse estudo foi elaborado com base nos dados extraídos da Coorte ROC. Após a extração dos bancos de nascimento, IG epigenética e 3 anos, esses foram combinados e as variáveis selecionadas para este estudo, utilizando o pacote estatístico Stata versão 14¹⁰⁴.

5.6.2. Tratamento das variáveis

A variável de desfecho PRIDI foi transformada em escore-z para normalizar sua distribuição e tornar os resultados comparáveis e foi utilizada como variável contínua.

O desfecho obesidade infantil foi gerado como variável binária (sim/não) a partir do escore-z peso-para-estatura. Os escores-z de peso-para-estatura, estatura-para-idade e peso-para-idade foram calculados pelo software Anthro da OMS¹⁴. Todas as crianças que na avaliação aos 3 anos estavam acima do escore-z 1,65 (percentil 95) de peso-para-estatura, foram classificadas como obesas.

As variáveis IG epigenética, aceleração da IG, AME e AM foram centralizadas para reduzir colinearidade e facilitar a interpretação dos resultados obtidos nas interações. A

centralização é feita pela subtração do valor médio da variável de cada uma das observações dessa mesma variável, ou seja, após a centralização a média dessa variável se torna zero, semelhante ao escore-z.

Estudos apontam que o nível SES está associado com a aceleração da IG⁶⁵, assim como com o desenvolvimento infantil^{105,106} e obesidade^{107,108}. Para a classificação do nível SES em nosso estudo, utilizamos os dados coletados de renda total da família, número total de moradores na casa, número de cômodos, quartos e banheiros, se a criança possuía sua própria cama e quarto, além da posse de bens como televisão, motocicleta e carro. Todas essas variáveis são fortemente correlacionadas, e se inseridas juntas, poderiam causar colinearidade e sobreajustar os modelos. Para contornar esse problema, utilizamos o método proposto por Vyas e Kumaranayake¹⁰⁹, que aplica a Análise de Componentes Principais (ACP) para construção de um indicador SES. O objetivo da ACP é extrair as informações mais importantes desse conjunto de dados e agregá-las em componentes principais (CPs) não correlacionados entre si, em que cada CP é uma combinação ponderada linear das variáveis iniciais¹⁰⁹. Após a aplicação da ACP, o primeiro componente principal foi extraído e categorizado em tercís (baixo, médio e alto) SES (Anexo I).

Foram coletados também dados sobre raça e escolaridade materna, ambas são associadas ao nível SES e podem agir como fatores de confusão para os desfechos analisados^{107,110}. A variável raça foi classificada em duas categorias: “Branca” e “Parda/Preta”, pois apenas quatro mães se auto reportaram como “Pretas”, dessa forma, ao reduzir o número de categorias, aumentamos o poder estatístico das análises. A variável educação foi classificada em três categorias: “educação primária ou menos”, “nível

secundário” e “nível superior”. A idade materna foi calculada com base na data de nascimento registrada no sistema HU-USP e a data do parto.

Os recursos relevantes para o desenvolvimento infantil mudam de acordo com a idade da criança, entretanto os efeitos do ambiente familiar e envolvimento dos pais são sempre importantes para seu desenvolvimento e desempenho escolar independentemente da idade da criança¹¹¹⁻¹¹⁵. Para avaliar esses aspectos, utilizamos o inventário HOME (*Home Observation for Measurement of the Environment*)¹¹⁶. Ele consiste em 45 itens observacionais referidos pelo cuidador para avaliar a qualidade do ambiente doméstico e é baseado em componentes como responsividade emocional e verbal do cuidador, punição e restrição, organização do ambiente físico e temporal, disponibilidade de materiais, brinquedos e jogos apropriados, envolvimento do cuidador com a criança, e oportunidade de variação na estimulação diária¹¹⁶. A pontuação final foi obtida pela somatória das subescalas, onde maiores pontuações indicam melhor ambiente doméstico e familiar para a criança.

Após o tratamento dos dados, realizamos a análise descritiva com a determinação das frequências e porcentagens das variáveis. Nas análises descritivas pudemos observar que variáveis importantes como as de amamentação possuíam uma grande proporção de não-resposta (>40%). A falha de obtenção de respostas sobre o elemento observado pode ocorrer em qualquer estudo por amostragem. Entretanto se essa ausência de informação ocorrer de maneira sistemática (não-aleatória), os resultados obtidos a partir desses dados poderão ser enviesados¹¹⁷.

Existem diversas técnicas utilizadas para lidar com a não-resposta em uma amostra como a Análise de Casos Completos (ACC), substituição dos valores ausentes pela média da variável e Imputação Múltipla por Equações em Cadeia (IMEC). Neste estudo

escolhemos utilizar IMEC por se tratar de uma técnica que lida com incerteza do valor real, criando vários conjuntos de dados imputados plausíveis diferentes e combinando adequadamente os resultados obtidos de cada um deles.

5.6.3. *Imputação Múltipla por Equações em Cadeia (IMEC)*

A IMEC consiste na execução de diversos modelos de regressão, onde cada variável com dados faltantes é modelada como dependente em relação às variáveis completas selecionadas como preditoras. Esse método considera a incerteza de cada valor imputado incluindo um componente aleatório nos resultados estimados, resultando em inferências mais precisas¹¹⁷⁻¹¹⁹.

O conceito por trás da IMEC é de que, para cada dado faltante, vários valores m plausíveis são imputados. Com isso, são obtidos m bancos de dados completos e cada conjunto de dados é analisado como caso completo. Após as imputações, a estimativa do parâmetro é obtida através da média das imputações múltiplas (IM) e o seu erro padrão obtido através da variância das IM¹¹⁸.

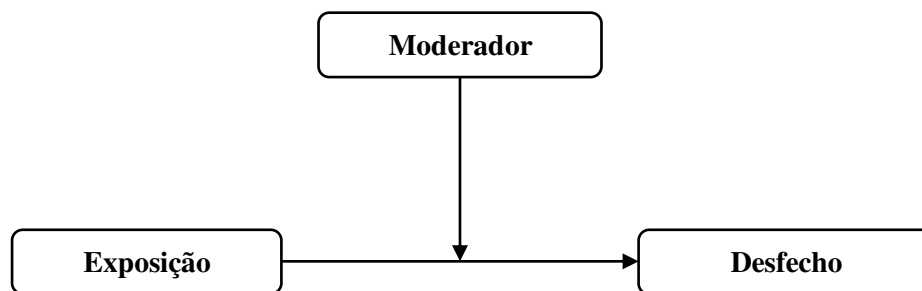
Após a aplicação da IMEC, a eficiência do modelo foi avaliada por meio da comparação dos parâmetros estimados por ACC e dados imputados. Todas as imputações foram realizadas utilizando o pacote MICE no programa Stata¹⁰⁴.

5.6.4. Análise de Moderação

O objetivo central das pesquisas em saúde é identificar variáveis independentes que exerçam influência sobre variáveis dependentes, ou pelo menos, identificar preditores que dos desfechos observados. Em alguns casos, não é razoável presumir que a relação entre exposição e desfecho seja a mesma para todos os indivíduos, mas que a associação depende de variáveis adicionais (moderador) em relação ao indivíduo ou de seu ambiente, que influenciam a associação entre a exposição e o desfecho.

A amamentação já foi apontada como possível modificadora das vias epigenéticas e estudos mostram que ela pode funcionar como fator moderador na interação entre genes e desfechos como asma, QI e obesidade. Neste estudo, iremos testar se a amamentação (exclusiva e total) exerce papel moderador entre as exposições ao estresse durante a gestação (IG epigenética e aceleração da IG) e o desenvolvimento e obesidade infantil tendo como base o modelo representado na **Figura 1**:

Figura 1. Modelo de moderação entre exposição e desfecho.



Fonte: Baron e Kenny (1986)

A moderação pode ser entendida como a alteração na relação causal entre duas variáveis em função da variável moderadora¹²⁰. O efeito da moderação pode se traduzir em termos de direção (inversão da relação exposição-desfecho) ou de intensidade (enfraquecimento ou fortalecimento da relação exposição-desfecho)¹²⁰.

Para testar se a amamentação (exclusiva e total) exerce papel moderador na associação entre IG epigenética/aceleração da IG e obesidade/desenvolvimento infantil, utilizamos modelos de regressão para estimar o efeito principal da exposição (IG epigenética ou aceleração da IG), o efeito principal da amamentação e o efeito da interação entre exposiçãoxamamentação. Assim, avaliamos a significância dos coeficientes padronizados da regressão e se a moderação é considerada válida, caso estatisticamente significativa.

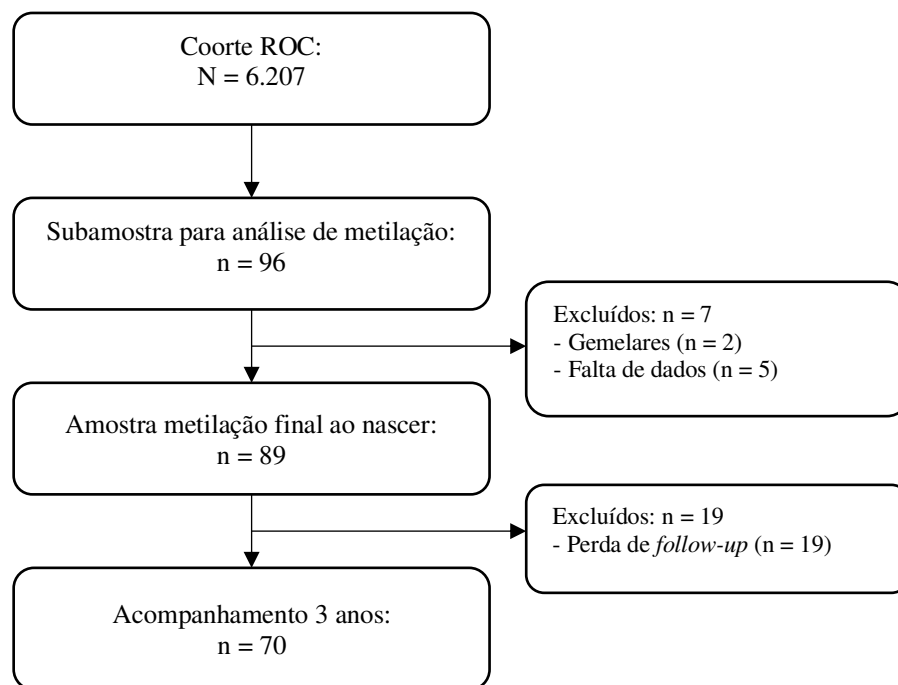
Regressões bivariadas foram realizadas entre os desfechos e as covariáveis para selecionar as variáveis de ajuste. As variáveis de ajuste foram selecionadas de acordo com seus valor-p e inseridas nos modelos utilizando o procedimento *stepwise forward*, onde se insere uma variável por vez, se p-valor < 0,2 na análise bivariada. Foi considerado nível de significância estatística de 5% em testes bicaudais.

6. RESULTADOS

6.1. Seleção da Amostra

Dentre as 96 mães selecionadas aleatoriamente para participar da coleta de sangue do cordão umbilical para a análise de metilação do DNA, duas foram excluídas por serem gestações gemelares e outras 5 por falta de dados, resultando em 89 díades mãe-neonato em nossa amostra inicial. Dessas, 70 (78,7%) participaram do acompanhamento de 3 anos e foram incluídas neste estudo (**Figura 2**).

Figura 2. Fluxograma do processo de seleção da amostra.



Os indivíduos acompanhados neste estudo (70) não diferiram daqueles que não foram acompanhados até os 3 anos (19) em relação às características observadas ao nascer como peso e comprimento ao nascer, IG cronológica, IG epigenética e aceleração da IG, e idade materna, conforme evidenciado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Teste-t avaliando a diferença entre a população final estudada e perdida entre o nascimento e 3 anos na subamostra da coorte ROC.

	Final (n = 70)	Perdida (n = 19)	<i>p-valor</i>
	Média ± DP	Média ± DP	
Peso ao nascer (g)	3313,7 ± 489,4	3326,4 ± 424,6	0,920
Comprimento ao nascer (cm)	48,6 ± 2,2	48,6 ± 0,47	0,872
Idade gestacional cronológica (semanas)	39,4 ± 1,5	39,3 ± 0,97	0,855
Idade gestacional epigenética (semanas)	38,7 ± 1,5	39,0 ± 1,06	0,450
Aceleração da idade gestacional (semanas)	-0,69 ± 1,98	0,38 ± 0,81	0,136
Idade materna (anos)	26,4 ± 6,6	25,4 ± 6,81	0,577

DP: desvio padrão

6.2. Características Maternas

Nossa amostra final foi composta por 70 mães (**Tabela 2**), similarmente divididas entre raça branca (52,4%) e preta/parda (48,6%), com idade no parto entre 16 e 46 anos. Destas 24 (34,3%) possuíam educação fundamental ou menos, 39 (55,7%) completaram o ensino médio e quatro (5,7%) possuíam educação superior. A classificação SES ficou distribuída em baixa (17,1%), média (51,4%) e alta (12,9%). Nenhuma das características maternas se associou com a IG epigenética ou com a aceleração da IG dos neonatos.

Tabela 2. Características maternas e sua associação com a idade gestacional epigenética e aceleração da idade gestacional do neonato.

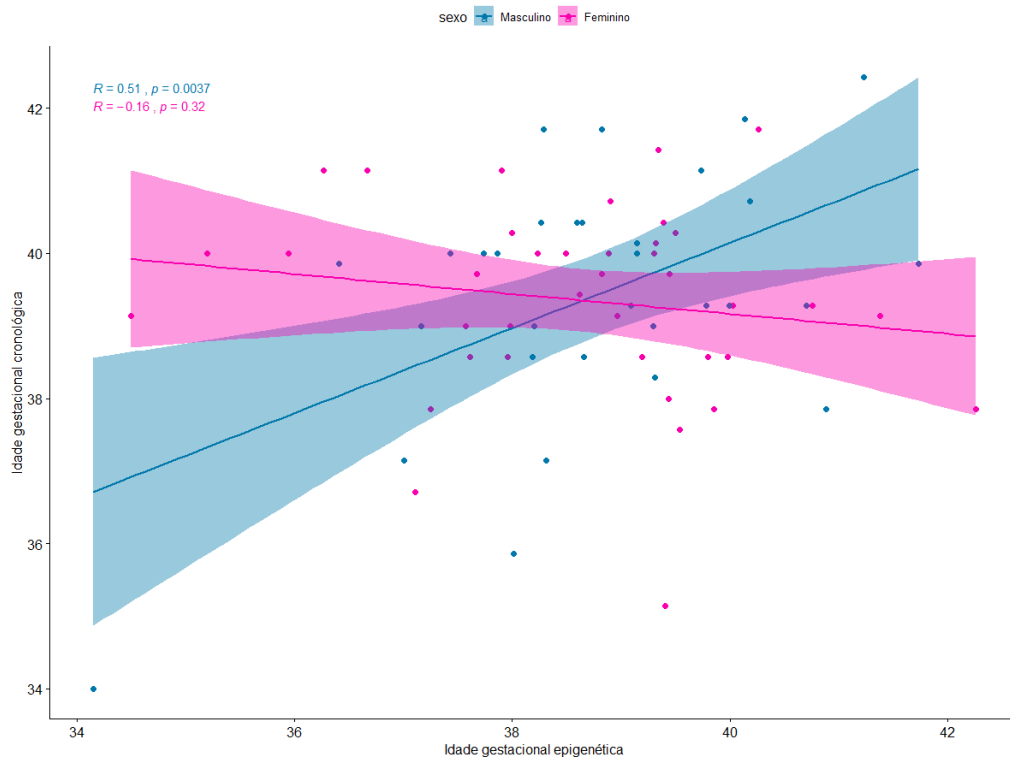
	n	%	Média ± DP	Mínimo	Máximo	IGE <i>p</i> -valor	AIG <i>p</i> -valor
Idade (anos)	70		26,4 ± 6,6	16	46	0,796	0,163
IMC pré-gestacional (kg/m ²)	55		25,1 ± 5,4	17,8	41,5	0,283	0,867
Ganho de peso gestacional (kg)	58		12,2 ± 5,7	-9	23	0,766	0,472
Escolaridade			-	-	-	0,732	0,639
Fundamental ou menos	24	34,3	-	-	-	-	-
Ensino médio	39	55,7	-	-	-	-	-
Superior	4	5,7	-	-	-	-	-
Não-resposta	3	4,3	-	-	-	-	-
Nível SES			-	-	-	0,283	0,286
Baixo	12	17,1	-	-	-	-	-
Médio	36	51,4	-	-	-	-	-
Alto	9	12,9	-	-	-	-	-
Não-resposta	13	18,6	-	-	-	-	-
Raça			-	-	-	0,282	0,405
Branca	36	51,4	-	-	-	-	-
Preta/Parda	34	48,6	-	-	-	-	-

IGE: idade gestacional epigenética; **AIG:** Aceleração da idade gestacional; **IMC:** Índice de massa corporal; **kg:** quilogramas; **m²:** metros quadrados; **DP:** desvio padrão. Todos os modelos foram ajustados para sexo da criança.

6.3. Características da Criança e Idade Gestacional Epigenética

A correlação entre a IG epigenética e IG cronológica foi baixa ($r = 0,17$, p -valor = 0,16) para os sexos combinados. Ao estratificar por sexo (**Figura 3**), a correlação se torna moderada para o sexo masculino ($r = 0,51$; p -valor = 0,003), e fraca e negativa para o sexo feminino ($r = -0,16$; p -valor = 0,32).

Figura 3. Coeficiente de correlação de Pearson entre idade gestacional cronológica e idade gestacional epigenética estratificadas por sexo.



Nossa amostra foi composta majoritariamente por crianças do sexo feminino (55,7%), nascidas com escore-z de peso-para-idade médio de 0,20 (DP \pm 1,09), e escore-z de comprimento-para-idade de -0,28 (DP \pm 1,21). A IG cronológica média foi de 39,4 (DP \pm 1,53) e IG epigenética foi de 38,7 (DP Análise de Casos Completos 1,55) semanas, sendo a diferença entre IG epigenética e IG cronológica (aceleração da IG) de -0,69 (DP \pm 1,98) semanas, como apresentado na **Tabela 3**. De acordo com a IG cronológica, quatro neonatos (5,7%) foram pré-termo, 65 (92,9%) de termo e um (1,4%) foi pós-termo; e de acordo com a IG epigenética, sete (10%) foram classificados como pré-termo, 62 (88,6%) como termo e um (1,4%) como pós-termo.

Tabela 3. Características do neonato.

	n	%	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Sexo (Feminino)	39	55,7	-	-	-
Peso ao nascer (kg)	70		3,31 ± 0,49	2,47	4,71
Escore-z peso-para-idade	68		0,20 ± 1,09	-2,0	2,0
Comprimento ao nascer (cm)	68		48,6 ± 2,17	44	53
Escore-z comprimento-para-idade	68		-0,28 ± 1,21	-2,9	2,4
Perímetro cefálico (cm)	68		34,4 ± 1,17	32	38
Perímetro abdominal (cm)	68		32,3 ± 2,14	28	38
Perímetro torácico (cm)	68		33,2 ± 1,74	30	38
APGAR 1 min	70		8,6 ± 1,69	1	10
APGAR 5 min	70		9,9 ± 0,34	8	10
Pequeno para idade gestacional (sim)	6	8,6	-	-	-
Idade gestacional cronológica (semanas)	70		39,39 ± 1,53	34,0	42,4
Idade gestacional epigenética (semanas)	70		38,70 ± 1,55	34,2	42,3
Aceleração da idade gestacional (semanas)	70		-0,69 ± 1,98	-4,88	4,40
Idade gestacional cronológica			-	-	-
Pré-termo (< 37 semanas)	4	5,7	-	-	-
Termo (≥37 e <41 semanas)	65	92,9	-	-	-
Pós-termo (≥ 42 semanas)	1	1,4	-	-	-
Idade gestacional epigenética			-	-	-
Pré-termo (< 37 semanas)	7	10,0	-	-	-
Termo (≥37 e <41 semanas)	62	88,6	-	-	-
Pós-termo (≥ 42 semanas)	1	1,4	-	-	-

Kg: quilogramas; **cm:** centímetros; **DP:** desvio padrão.

Ao nascer, a aceleração da IG foi associada com a redução de 0,31 cm no perímetro torácico (95%IC: -0,58; -0,03) e um aumento de 0,42 DP no escore-z de comprimento-para-idade (95%IC: 0,02; 0,83), como é evidenciado na **Tabela 4**. Peso ao nascer teve uma leve associação negativa com aceleração da idade epigenética, sendo que a cada semana adicional de aceleração, houve uma redução de 0,001 gramas do peso do neonato (95%IC: -0,00; -

0,00). Apesar da IG epigenética estar mais correlacionada com a IG cronológica no sexo masculino, IG epigenética e aceleração da idade epigenética não foram associadas ao sexo do neonato.

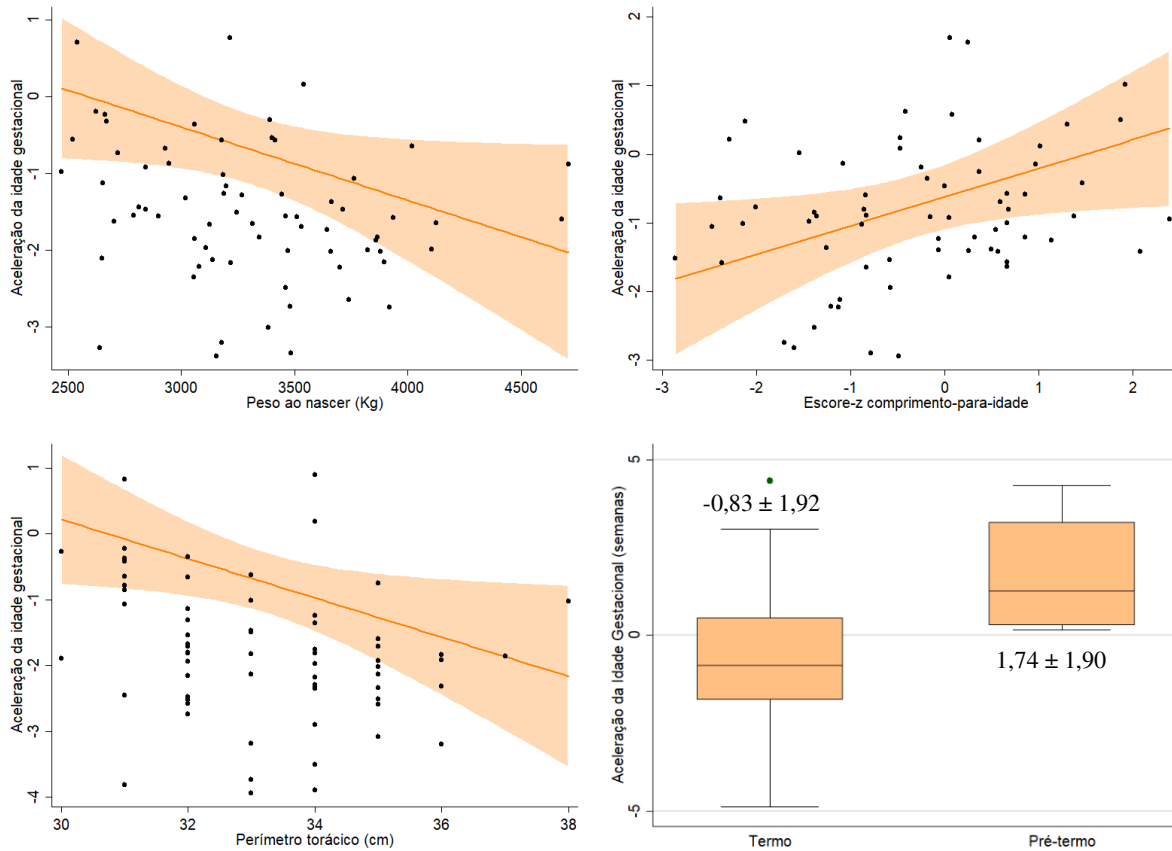
Crianças nascidas pré-termo de acordo com a classificação da IG cronológica, tiveram uma aceleração da IG 2,6 semanas maior quando comparadas às crianças nascidas a termo (95%IC: 0,60-4,54). A IG epigenética, como esperado, foi menor nas crianças pré-termo segundo a IG cronológica (95%IC: -3.12; 0.05). Na **Figura 4** podemos observar a associação entre aceleração da IG e peso ao nascer, escore-z comprimento-para-idade e perímetro torácico, e o box-plot da distribuição da aceleração de acordo com a classificação da IG cronológica.

Tabela 4. Associação entre as características do neonato e a idade gestacional epigenética e aceleração da idade epigenética.

Exposição	IG epigenética	Aceleração da IG
	β (95%IC) <i>p</i> -valor	β (95%IC) <i>p</i> -valor
Sexo (Feminino)	0,14 (0,89; 0,60) 0,704	-0,07 (-1,03; 0,89) 0,885
Peso ao nascer (kg)	0,00 (-0,00, 0,00) 0,872	-0,00 (-0,00; -0,00) 0,047
Escore-z peso-para-idade	-0,13 (-0,48; 0,22) 0,470	0,09 (-0,36; 0,54) 0,680
Comprimento ao nascer (cm)	0,14 (-0,04; 0,33) 0,133	-0,07 (-0,31; 0,17) 0,577
Escore-z comprimento-para-idade	0,14 (-0,18; 0,46) 0,384	0,42 (0,02; 0,83) 0,040
Perímetro cefálico (cm)	-0,05 (0,39; 0,29) 0,766	-0,25 (-0,68; 0,19) 0,258
Perímetro abdominal (cm)	0,03 (-0,21; 0,15) 0,755	-0,15 (-0,37; 0,08) 0,199
Perímetro torácico (cm)	-0,01 (-0,24; 0,21) 0,900	-0,31 (-0,58; -0,03) 0,030
APGAR 1 min	0,02 (-0,20; 0,24) 0,878	-0,13 (-0,41; 0,15) 0,365
APGAR 5 min	-0,30 (-1,38; 0,79) 0,587	-0,47 (-1,86; 0,92) 0,503
Pequeno para idade gestacional	0,17 (-1,18; 1,51) 0,806	-0,13 (-1,86; 1,59) 0,876
Idade gestacional cronológica		
Pré-termo (< 37 semanas)	-1,59 (-3,13; -0,04) 0,045	2,57 (0,59; 4,56) 0,012
Termo (≥ 37 e <41 semanas)	Ref.	Ref.
Pós-termo (≥ 42 semanas)	2,42 (-0,63; 5,48) 0,117	-0,40 (-4,31; 3,52) 0,841

IG: idade gestacional; β : beta; 95%IC: intervalo de confiança de 95%. Todos os modelos foram ajustados para sexo, menos quando sexo era o desfecho.

Figura 4. Associação entre aceleração da idade epigenética e peso ao nascer, escore-z comprimento-para-idade, perímetro torácico e *Box-plot* da distribuição da aceleração da idade gestacional de acordo com a classificação de idade gestacional cronológica.



No acompanhamento de 3 anos as crianças tinham em média 43,7 meses ($DP \pm 4,06$), com escore-z de peso-para-idade de $-0,32$ ($DP \pm 1,33$), estatura-para-idade de $1,06$ ($DP \pm 1,77$) e peso-para-estatura de $0,45$ ($DP \pm 1,21$), sendo que 15,7% (11) foram classificadas como obesas (**Tabela 5**). O tempo médio de AME foi de 4,68 ($DP \pm 1,45$) meses e AM total de 10,32 ($DP \pm 7,98$) meses, e as crianças obtiveram pontuação total média no PRIDI de 35,87 ($DP \pm 15,98$), e 0,00 quando transformado em escore-z ($DP \pm 1,00$).

Tabela 5. Características da criança no acompanhamento de 3 anos.

	N (70)	%	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Idade (meses)	70	-	43,70 ± 4,06	36	52
Amamentação exclusiva (meses)	38	-	4,68 ± 1,45	1	7
Amamentação total (meses)	37	-	10,32 ± 7,98	1	47
PRIDI total	70	-	35,87 ± 15,98	0	58
PRIDI escore-z	70	-	0,00 ± 1,00	-2,3	1,4
Escore-z peso-para-idade	68	-	-0,32 ± 1,33	-3,9	2,7
Escore-z estatura-para-idade	67	-	-1,06 ± 1,77	-5,3	4,3
Escore-z peso-para-estatura	67	-	0,45 ± 1,21	-2,3	2,9
Obesidade (sim)	11	15,7	-	-	-
Inventário HOME	33	-	38,6 ± 9,34	15	50

DP: desvio padrão.

No acompanhamento de 3 anos, apenas o escore-z da estatura-para-idade teve uma associação marginal com IG epigenética (95%IC: -0,00; 0,42). A aceleração da IG não foi associada a nenhuma característica da criança aos 3 anos (**Tabela 6**).

Tabela 6. Associação entre as características da criança no acompanhamento e idade gestacional epigenética e aceleração da idade epigenética.

Exposição	IG epigenética	Aceleração da IG
	β (95%IC) p-valor	β (95%IC) p-valor
PRIDI total	0,01 (-0,01; 0,04) 0,315	0,01 (-0,02; 0,05) 0,466
PRIDI escore-z	0,19 (-0,18; 0,56) 0,315	0,18 (-0,30; 0,65) 0,466
Escore-z peso-para-idade	0,17 (-0,11; 0,45) 0,228	0,13 (-0,24; 0,49) 0,493
Escore-z estatura-para-idade	0,21 (-0,00; 0,42) 0,052	0,18 (-0,09; 0,46) 0,185
Escore-z peso-para-estatura	-0,08 (-0,40; 0,23) 0,607	-0,11 (-0,52; 0,29) 0,580
Obesidade (sim)	-0,15 (-1,18; 0,87) 0,776	-0,44 (-1,75; 0,87) 0,508

IG: idade gestacional; β: coeficiente beta; 95%IC: intervalo de confiança de 95%.

6.4. Análise de Moderação

Após a aplicação da Imputação Múltipla por Equações em Cadeia (IMEC) descrita no Anexo II para lidar com as não-respostas das variáveis, prosseguimos para a etapa de avaliação do efeito moderador da amamentação nas relações entre IG epigenética e aceleração da IG, e os desfechos de desenvolvimento (PRIDI) e Obesidade aos 3 anos. Utilizamos o procedimento descrito por Baron & Kenny¹²⁰ que consiste em quatro etapas: centralização, criação da variável de interação, regressão por blocos e avaliação da interação.

Como descrito, a primeira etapa foi a centralização das variáveis independentes (IG epigenética e aceleração da IG) e das variáveis moderadoras (AME e AM total). A centralização tem como finalidade reduzir a colinearidade entre as variáveis independentes e moderadoras no modelo de regressão. A **Tabela 7** apresenta as médias e desvio padrão das variáveis antes e após a centralização.

Tabela 7. Médias e desvio padrão das variáveis independentes e moderadoras.

	n	Média	Desvio Padrão
Idade gestacional epigenética	70	38,70	1,55
Idade gestacional epigenética (c)	70	0,00	1,55
Aceleração da idade gestacional	70	-0,69	1,98
Aceleração da idade gestacional (c)	70	0,00	1,98
Amamentação exclusiva	70	4,57	2,61
Amamentação exclusiva (c)	70	-0,03	1,56
Amamentação total	70	9,92	10,66
Amamentação total (c)	70	-0,10	7,97

(c) variáveis centralizadas.

Na **Tabela 8** podemos observar as regressões por blocos. No primeiro bloco (Modelo 1), consideramos a variável independente e a variável moderadora isolada. No segundo bloco (Modelo 2), a variável de interação foi inserida, e no terceiro bloco (Modelo 3) adicionamos as demais variáveis de confusão seguindo o procedimento *stepwise forward*, inserindo todas as variáveis que apresentaram p -valor $< 0,2$ na análise bivariada, conforme **Tabela A4** (Anexo III).

No primeiro bloco (Modelo 1) do desfecho PRIDI sem a interação entre IG epigenética \times AME, observamos que a AME se associa positivamente com o desfecho PRIDI, aumentando em 0,22 SD o escore-z de PRIDI a cada mês adicional de AME (95%IC: 0,01; 0,44). Ao inserirmos a variável de interação IG epigenética \times AME, essas associações são enfraquecidas sendo a interação também não significativa. Ao adicionarmos as covariáveis (Modelo 3) no modelo de interação entre IG epigenética \times AME, apenas o escore do HOME se torna marginalmente associado ao desfecho (β : 0,04 [-0,00-0,07] p -valor = 0,051). No Modelo 1 (sem interação) de aceleração da IG \times AME, não houve nenhuma associação entre as variáveis independentes e PRIDI. No Modelo 2 (com interação), a variável de interação também não foi significativa. Entretanto, no Modelo 3 (com interação + covariáveis), o escore do HOME se associou positivamente ao desfecho (β : 0,04 [0,00-0,07]; p -valor = 0,048).

O mesmo padrão dos modelos anteriores, se manteve quando avaliamos as interações entre IG epigenética \times AM total e aceleração da IG \times AM total, ou seja, as variáveis independentes e de interação não se associaram ao desfecho PRIDI. Contudo, ao avaliarmos o terceiro bloco (Modelo 3) da interação entre IG epigenética \times AM total, o nível SES Alto (β : 0,74 [0,09-1,39]; p -valor = 0,026) e o escore de HOME (β : 0,04 [0,00-0,07]; p -valor =

0,048) se associaram positivamente ao desfecho, sendo a interação IG epigenética×AM total não significativa. Similar ao modelo anterior, a interação aceleração da IG×AM total não foi estatisticamente significativa, mas o nível SES Alto (β : 0,72 [0,06-1,39]; p -valor = 0,033) e escore de HOME (β : 0,04 [0,00-0,07]; p -valor = 0,033) foram positivamente associados ao desfecho PRIDI.

Para o desfecho Obesidade não foi encontrada nenhuma associação ou interação significativa entre os fatores analisados neste estudo.

Tabela 8. Regressão por blocos para avaliar a interação entre a amamentação exclusiva e total com a idade gestacional epigenética e aceleração da idade gestacional nos desfechos PRIDI e Obesidade aos 3 anos.

	Modelo 1		Modelo 2		Modelo 3	
	Sem interação		Com interação		Com interação + covariáveis	
	β (95%IC)	<i>p</i>	β (95%IC)	<i>p</i>	β (95%IC)	<i>p</i>
PRIDI – Idade gestacional epigenética – Amamentação exclusiva						
IG epigenética	0,09 (-0,08; 0,25)	0,297	0,08 (-0,08; 0,25)	0,322	0,12 (-0,03; 0,27)	0,122
AME	0,22 (0,01; 0,44)	0,043	0,22 (-0,00; 0,44)	0,051	0,09 (-0,15; 0,33)	0,454
Sexo ^a					0,09 (-0,42; 0,59)	0,738
Idade materna ^b					-0,01 (-0,66; 0,64)	0,262
Nível SES					Ref.: Baixo	
Médio					-0,01 (-0,66; 0,64)	0,970
Alto					0,59 (-0,08; 1,26)	0,082
HOME					0,04 (-0,00; 0,07)	0,051
IGE×AME			0,02 (-0,13; 0,18)	0,789	0,04 (-0,09; 0,18)	0,532
PRIDI – Aceleração da idade gestacional – Amamentação exclusiva						
Aceleração da IG	0,02 (-0,11; 0,15)	0,752	0,02 (-0,12; 0,15)	0,792	0,06 (-0,08; 0,19)	0,405
AME	0,21 (-0,00; 0,42)	0,052	0,22 (-0,00; 0,43)	0,055	0,08 (-0,17; 0,32)	0,526
Sexo ^a					0,09 (-0,45; 0,63)	0,742
Idade materna ^b					-0,02 (-0,06; 0,02)	0,310
Nível SES					Ref.: Baixo	
Médio					-0,00 (-0,66; 0,66)	0,996
Alto					0,58 (-0,11; 1,27)	0,097
HOME					0,04 (0,00; 0,07)	0,048
AIG×AME			0,01 (-0,11; 0,13)	0,893	0,02 (-0,10; 0,14)	0,729
PRIDI – Idade gestacional epigenética – Amamentação total						
IG epigenética	0,08 (-0,07; 0,25)	0,289	0,09 (-0,07; 0,25)	0,250	0,13 (-0,02; 0,28)	0,084
AM total	0,03 (-0,01; 0,07)	0,135	0,03 (-0,01; 0,06)	0,193	0,02 (-0,02; 0,06)	0,268
Sexo ^a					0,05 (-0,45; 0,55)	0,830
Idade materna ^b					-0,02 (-0,06; 0,02)	0,283
Nível SES					Ref.: Baixo	
Médio					0,11 (-0,52; 0,74)	0,732
Alto					0,74 (0,09; 1,39)	0,026
HOME					0,04 (0,00; 0,07)	0,036
IGE×AM			0,01 (-0,02; 0,05)	0,414	0,01 (-0,02; 0,04)	0,425
PRIDI – Aceleração da idade gestacional – Amamentação total						
Aceleração da IG	0,04 (-0,08; 0,16)	0,508	0,04 (-0,08; 0,17)	0,493	0,07 (-0,06; 0,19)	0,277
AM total	0,03 (-0,01; 0,06)	0,148	-0,03 (-0,01; 0,07)	0,202	0,02 (-0,02; 0,06)	0,313
Sexo ^a					0,04 (-0,46; 0,55)	0,868
Idade materna ^b					-0,02 (-0,05; 0,02)	0,368
Nível SES					Ref.: Baixo	
Médio					0,11 (-0,53; 0,75)	0,729
Alto					0,72 (0,06; 1,39)	0,033
HOME					0,04 (0,00; 0,07)	0,033
AIG×AM			0,00 (-0,02; 0,03)	0,752	0,00 (-0,02; 0,03)	0,664

(continuação)

Tabela 8. Regressão por blocos para avaliar a interação entre a amamentação exclusiva e total com a idade gestacional epigenética e aceleração da idade gestacional nos desfechos PRIDI e Obesidade aos 3 anos.

	Modelo 1		Modelo 2		Modelo 3	
	Sem interação		Com interação		Com interação + covariáveis	
	OR (95%IC)	<i>p</i>	OR (95%IC)	<i>p</i>	OR (95%IC)	<i>p</i>
Obesidade – Idade gestacional epigenética – Amamentação exclusiva						
IG epigenética	0,91 (0,59; 1,42)	0,692	0,93 (0,58; 1,49)	0,763	0,81 (0,49; 1,35)	0,423
AME	0,85 (0,42; 1,68)	0,633	0,89 (0,42; 1,76)	0,671	0,91 (0,45; 1,83)	0,787
Déficit de crescimento					0,15 (0,02; 1,42)	0,098
<i>IGE</i> × <i>AME</i>			0,93 (0,64; 1,35)	0,697	0,94 (0,63; 1,39)	0,743
Intercepto	0,18 (0,09; 0,37)	0,000	0,18 (0,08; 0,37)	0,000	0,26 (0,12; 0,59)	0,001
Obesidade – Aceleração da idade gestacional – Amamentação exclusiva						
Aceleração da IG	0,89 (0,63; 1,26)	0,508	0,87 (0,59; 1,28)	0,472	0,80 (0,53; 1,22)	0,308
AME	0,86 (0,44; 1,66)	0,648	0,88 (0,42; 1,84)	0,726	0,96 (0,47; 1,94)	0,899
Déficit de crescimento					0,16 (0,02; 1,45)	0,103
<i>AIE</i> × <i>AME</i>			1,04 (0,73; 1,47)	0,834	1,05 (0,72; 1,52)	0,795
Intercepto	0,18 (0,09; 0,37)	0,000	0,18 (0,09; 0,37)	0,000	0,26 (0,12; 0,57)	0,001
Obesidade – Idade gestacional epigenética – Amamentação total						
IG epigenética	0,94 (0,62; 1,41)	0,753	0,92 (0,60; 1,42)	0,712	0,75 (0,45; 1,22)	0,244
AM total	0,99 (0,88; 1,12)	0,933	0,99 (0,87; 1,13)	0,918	1,00 (0,88; 1,14)	0,982
Déficit de crescimento					0,08 (0,01; 1,40)	0,084
<i>IGE</i> × <i>AM</i>			0,97 (0,89; 1,05)	0,394	0,94 (0,86; 1,03)	0,184
Intercepto	0,19 (0,10; 0,38)	0,000	0,19 (0,09; 0,37)	0,000	0,28 (0,13; 0,60)	0,001
Obesidade – Aceleração da idade gestacional – Amamentação total						
Aceleração da IG	0,89 (0,64; 1,24)	0,483	0,89 (0,63; 1,25)	0,486	0,81 (0,56; 1,17)	0,259
AM total	1,00 (0,89; 1,12)	0,956	1,00 (0,87; 1,14)	0,957	1,01 (0,87; 1,16)	0,931
Déficit de crescimento					0,12 (0,01; 1,35)	0,086
<i>AIE</i> × <i>AM</i>			0,99 (0,93; 1,05)	0,764	0,97 (0,91; 1,05)	0,504
Intercepto	0,19 (0,10; 0,38)	0,000	0,19 (0,10; 0,38)	0,000	0,28 (0,13; 0,60)	0,001

^a idade em anos; ^b sexo feminino; **IG:** idade gestacional; **AME:** amamentação exclusiva; **AM:** amamentação total; **SES:** socioeconômico; **β:** beta; **OR:** Odds ratio (razão de chance).

7. DISCUSSÃO

Nós mostramos neste estudo que diversas características conhecidas por refletirem a exposição às adversidades no período intrauterino foram associadas à aceleração da IG ao nascer. A hipótese da DOHaD sugere que durante períodos sensíveis e de alta plasticidade, como o período intrauterino, as adversidades sofridas podem modular o epigenoma do indivíduo produzindo consequências imediatas como baixo peso ao nascer^{12,52-55} e também consequências a longo prazo para a saúde^{54,56,57}. A aceleração da idade epigenética já foi associada a mortalidade⁴⁴⁻⁴⁶, menopausa⁴⁷, menor função física e cognitiva⁴⁸, Alzheimer⁴⁹ e obesidade^{50,51} em adultos. No entanto, ainda não é claro se a aceleração da IG ao nascer é um fator positivo ou negativo para a saúde dos neonatos e como impacta a saúde do indivíduo no decorrer do tempo.

O peso ao nascer é largamente utilizado como “proxy” de restrição intrauterina em estudos que visam investigar o ambiente intrauterino e sua associação com desfechos no curto e longo prazo^{12,121,122}. O baixo peso ao nascer está associado à maior mortalidade no primeiro ano de vida, restrição no crescimento e desenvolvimento cognitivo, síndrome metabólica e doenças coronarianas¹²³. Em nosso estudo, peso ao nascer e perímetro torácico mostraram-se negativamente associados à aceleração da IG. Apesar da fraca associação com peso ao nascer, nossos resultados corroboram os achados de Girchenko et al. (2017)¹¹⁰ que encontraram forte associação negativa entre aceleração da IG e peso ao nascer, comprimento e perímetro cefálico. Em contraste, apesar de nossos resultados apontarem para uma

associação negativa, nós não evidenciamos as associações encontradas por Girchenko et al. (2017)¹¹⁰ entre a aceleração da idade gestacional epigenética e idade materna acima de 40 anos, APGAR 1-min e sexo feminino.

Na direção oposta, Khouja et al. (2018)¹²⁴ encontraram associações positivas entre aceleração da IG, peso e comprimento ao nascer, sexo e IMC pré-gestacional, assim como Bright et al. (2019)⁶⁸ que também encontraram associações positivas com peso e comprimento ao nascer. As discrepâncias encontradas entre os resultados publicados, talvez possam ser explicadas pelas diferentes metodologias utilizadas para o cálculo da IG epigenética e aceleração da IG. Girchenko et al. (2017)¹¹⁰, assim como em nosso estudo, aplicaram o método proposto por Knight et al. (2016)⁶⁵ que selecionou a partir dos dados de 15 coortes de diferentes ancestralidades, incluindo dados de nascimentos pré- e pós-termo, 148 sítios CpGs utilizados para estimar a IG epigenética. Enquanto os estudos de Khouja et al. (2018)¹²⁴ e Bright et al. (2019)⁶⁸ utilizaram o método proposto por Bohlin et al. (2016)¹²⁵ que foi desenvolvido a partir dos dados da coorte MoBa, que não incluiu nascimentos pré-termo e utiliza 96 sítios CpGs para estimar a IG epigenética. Outro ponto relevante, é de que em nosso estudo e no de Girchenko et al. (2017)¹¹⁰ a aceleração da IG foi baseada na diferença bruta entre IG cronológica e epigenética, e não nos valores residuais da regressão entre IG cronológica e IG epigenética, como nos estudos de Khouja et al. (2018)¹²⁴ e Bright et al. (2019)⁶⁸.

Em nosso estudo também encontramos que a aceleração da IG foi significativamente maior em crianças prematuras se comparadas com as crianças nascidas termo. O estudo de Knight et al. (2018)¹²⁶ encontrou que a aceleração da IG estava associada à redução de intervenções respiratórias (ventilação assistida) e uso de surfactantes e corticosteroides em

bebês nascidos com <28 semanas, sugerindo que a aceleração da IG pode ser um aspecto clinicamente relevante da maturidade do desenvolvimento. Um estudo que avaliou o perfil neurocomportamental em crianças nascidas muito prematuras (<30 semanas) encontrou que aquelas que tinham perfil neurocomportamental ideal tinham idade epigenética maior se comparados aos de perfil atípico. Estes, por sua vez, possuíam diversos sítios CpGs diferencialmente metilados em múltiplos genes ligados à estrutura, função ou condições neurocomportamentais ou neurodegenerativas¹²⁷. De fato, ainda não se pode afirmar qual o papel da IG epigenética no desenvolvimento intrauterino ou durante a infância, mas a aceleração da IG nesse grupo parece indicar um “*catch-up*” e ser positiva para os desfechos neonatais e desenvolvimento infantil.

Nossos resultados indicam que a IG epigenética e a aceleração da IG não estão associadas ao desenvolvimento infantil aos 3 anos. No estudo de Suarez et al. (2018)⁶⁷, os pesquisadores encontraram que a menor IG epigenética parece estar associada a uma desvantagem de desenvolvimento infantil em meninos, que aos 3 anos, apresentaram mais problemas totais e internalizantes. Esses achados são de certa maneira surpreendentes, pois na população adulta é observado o oposto, onde os desfechos negativos são mais associados a uma idade epigenética maior do que a idade cronológica. Em outro estudo do mesmo grupo, Suarez et al. (2018)¹²⁸ encontraram que na adolescência a situação se invertia, a aceleração da IG se associou positivamente a problemas internalizantes, mas não encontram associações com função cognitiva e inteligência. Apesar desses resultados apontarem em direções opostas, o perfil da metilação do DNA se altera com o decorrer do tempo³⁹, sendo que as maiores taxas de alteração são encontradas entre os 2 e 10 anos de idade³⁸, então não podemos descartar que o papel da aceleração da IG varie no decorrer da infância.

Semelhantemente ao desenvolvimento infantil, nós também não encontramos associação entre a IG epigenética e obesidade aos 3 anos. Nosso resultado corrobora um estudo publicado recentemente que analisou a trajetória de crescimento de crianças do nascimento até os 10 anos⁶⁸. Nele, a aceleração da IG estava associada ao peso e comprimento ao nascer e que essa diferença persistiu até aproximadamente 9 meses de idade⁶⁸. A partir dos 9 meses, essas diferenças se atenuaram e, eventualmente reverteram para o peso, resultando em aproximadamente menos 0,6 kg de peso aos 10 anos de idade por semana de aceleração da IG epigenética⁶⁸. O estudo de Simpkin et al.⁶⁹ também aponta que crianças com maior aceleração da IG ao nascer ganham peso mais rápido, tem maior IMC e mais massa gorda ao nascer, entretanto elas têm aumento mais lento de massa gorda durante a infância e adolescência⁶⁹. Quando avaliadas aos 7 anos, crianças com a idade epigenética maior do que idade cronológica eram mais altas, mas não havia diferença no peso ou IMC⁶⁹.

A atenuação e alteração das associações entre a aceleração da IG ao nascer e crescimento durante a infância, pode ser, assim como para o desenvolvimento infantil, devido a alterações do perfil da metilação do DNA durante a infância^{38,39}. Além da possível alteração do perfil epigenético durante os períodos de maior plasticidade, as alterações na taxa de crescimento também podem ser devidas a mecanismos biológicos compensatórios que se ajustam de acordo com as exposições sofridas durante a gestação bem como exposições ambientais após o nascimento⁷³. Em adultos, obesidade foi associada a aceleração da IG em tecido hepático⁵⁰ e tecido adiposo visceral¹²⁹. Porém diferente do que é observado em crianças (rápida alteração do perfil epigenético), a aceleração da idade epigenética no fígado parece não sofrer alterações mesmo após rápida perda de peso induzida por cirurgia bariátrica⁵⁰. Já no tecido adiposo visceral, a aceleração da idade

epigenética aparenta desempenhar um papel importante na dinâmica da perda de peso após cirurgia bariátrica¹²⁹. Os achados de Nevalainen et al. (2017)⁵¹ também sugerem que a aceleração da idade epigenética ao invés de ser fator que afeta o IMC, parece ser um desfecho do ganho de peso ao longo do tempo⁵¹.

No contexto da DOHaD, modificações epigenéticas constituem um possível mecanismo para explicar esses efeitos^{73-75,130,131}. Como mencionado na introdução, evidências confirmam a importância da amamentação para o desenvolvimento neurocognitivo^{22,85}, redução do risco de infecções respiratórias²¹, obesidade infantil^{23,31}, diabetes do tipo 2⁸⁹ e também como possível modificador de vias epigenéticas^{85-87,132}. Apesar disso, os estudos que examinam as associações entre IG epigenética desenvolvimento físico e neurocognitivo durante a infância, apesar de incluírem diversas covariáveis importantes, como nível SES, IMC pré-gestacional materno, consumo de álcool e fumo, a amamentação foi pouco ou quase nada avaliada. No nosso conhecimento, apenas o estudo de Simpkin et al. (2016)⁹⁰ investigou se a amamentação (sim/não) se associava com a aceleração da IG na infância e adolescência. Nesse estudo, os autores não encontraram associações entre amamentação e aceleração da epigenética em nenhuma das idades avaliadas.

Em nosso estudo, os resultados não sustentam a hipótese inicial de que a amamentação melhora o desenvolvimento infantil e reduz a obesidade, além de moderar o efeito da IG epigenética nos desfechos aos 3 anos. Contudo, não são poucas as evidências que demonstram que a amamentação é um componente importante para garantir o desenvolvimento cognitivo saudável e o crescimento físico das crianças. Adicionalmente, em estudo conduzido por outros membros da nossa equipe, verificamos associações

importantes entre amamentação e desenvolvimento da criança aos 3 anos¹³³. Neste estudo os autores mostraram que crianças da Coorte ROC amamentadas exclusivamente por 6 meses e que receberam leite materno até os 2 anos de idade tiveram um aumento de 0,4 DP no escore PRIDI (β : 0,38; limites de confiança: 0,23; 0,53) no acompanhamento de 3 anos.

Estudos apontam que a amamentação está associada à responsividade parental, que pode ser responsável, em parte, pelos benefícios da amamentação para o desenvolvimento infantil¹³⁴. Em nosso estudo, pudemos observar que o fator positivo mais homogêneo para o desenvolvimento infantil foi o inventário HOME, que avalia a qualidade do ambiente e a estimulação da criança. Diversos estudos apontam que a qualidade e a quantidade de cuidados recebidos dos pais ou cuidadores, assim como outras interações sociais positivas, influenciam fortemente o desenvolvimento cognitivo e inteligência da criança¹³⁵. Embora não tenhamos encontrado associação entre o escore de HOME e tempo de amamentação, estudos apontam que a duração da amamentação está associada com práticas parentais positivas durante a infância¹³⁴ e níveis de cuidado e atenção dada à criança¹³⁶, fatores chave para o desenvolvimento infantil. Neste contexto, mães que optam ou são bem-sucedidas na amamentação podem estar mais inclinadas a nutrir ou estimular seus filhos de várias outras maneiras e assim, a amamentação pode ser um fator mediador entre o ambiente e o desenvolvimento infantil.

Outro fator importante para o desenvolvimento infantil é o SES. O SES refere-se ao lugar de um indivíduo na sociedade e influencia fortemente a experiência individual desde a infância e até vida adulta, afetando seu desenvolvimento e desfechos em saúde^{105,137-139}. Crianças de baixo SES estão em maior risco de não atingirem seu potencial de desenvolvimento se comparadas à crianças da mesma idade de maior SES^{140,141}. Elas

também frequentemente entram na pré-escola com menor aparato linguístico¹⁴², que influencia sua performance e frequência escolar, o que posteriormente, está relacionado a maior evasão escolar¹⁴³. Nossos achados mostram que crianças de alto SES obtiveram cerca de 11 pontos a mais no escore de PRIDI se comparadas às crianças de baixo SES nos modelos de AM total. O SES também tem influência na escolha de amamentar¹⁴⁴, na duração da amamentação e no uso de chupetas e mamadeiras¹⁴⁵. Apesar das recomendações do Ministério da Saúde e OMS sobre amamentação exclusiva e complementada até os dois anos, a amamentação não pode ser descrita simplesmente como uma escolha da mãe. A estrutura social de proteção a amamentação e apoio familiar podem ter influências determinantes para o início e continuação da amamentação, sendo que a volta ao trabalho, principalmente em mulheres advindas de grupos sociais mais vulneráveis, é determinante para o início e continuação da amamentação^{146,147}.

Nosso estudo apresenta algumas limitações. Estudos que avaliam o perfil epigenético e os efeitos da amamentação requerem cautela, por não ser viável ou ético simplesmente atribuir a amamentação aleatoriamente às mães como é feito em ensaios clínicos. Portanto, é preciso avaliar o ambiente ao qual as crianças estão expostas para conseguir separar o efeito do ambiente do efeito da amamentação (que pode ser sutil) no desenvolvimento físico e neurocognitivo da criança. Ajustar as análises para esses fatores adicionais, principalmente quando os coeficientes são muito próximos de 0, poderiam reduzir os efeitos da IG epigenética e da amamentação, que talvez deixem de ser estatisticamente significante no modelo, tornando-se variáveis não explanatórias, mas possíveis marcadores. Neste contexto, o nosso tamanho amostral pode ser considerado um grande fator limitante, pois quanto menor o efeito, maior precisa ser a amostra para conseguir estimar os valores reais^{148,149}.

Também é importante ressaltar o fato de que os dados de amamentação foram obtidos através do questionário de acompanhamento aos 3 anos e esses dados, principalmente de amamentação exclusiva, podem estar sujeitos ao viés de memória. A duração total da amamentação tende a ser lembrada de maneira mais acurada do que a de amamentação exclusiva, pois essa depende de quando líquidos e outros alimentos foram introduzidos na alimentação da criança^{102,103}. No entanto, os dados tendem a ser confiáveis principalmente em estudos onde o acompanhamento é feito de maneira contínua como o nosso. No estudo de Burnham et al. (2014)¹⁵⁰, os pesquisadores coletaram dados sobre amamentação exclusiva prospectivamente nos primeiros 6 meses de vida do bebê e depois aos dois anos pós-parto para avaliar a diferença entre os relatos. Eles mostraram que 30% das mães reportaram no acompanhamento de dois anos dados que eram semelhantes aos coletados prospectivamente durante os 6 meses, os pesquisadores também encontraram que os relatos aos 2 anos tendiam a superestimar o tempo de amamentação exclusiva. Em áreas onde a amamentação exclusiva é amplamente promovida esse viés pode ser ainda maior pelo desejo de aceitação social¹⁰³. Em nosso estudo, todas as mães foram acompanhadas desde o nascimento e entrevistadas em um período semelhante pós-parto, elas também são todas de uma mesma região de saúde, ou seja, foram possivelmente expostas semelhantemente às ações de promoção ao aleitamento materno. Apesar do viés de memória, acreditamos que o viés é semelhante para todas as mães não causando diferença sistemática em nossos resultados.

Outro fator que pode ser considerado como limitante neste estudo é a taxa de não-resposta em nossas variáveis de amamentação. De longe, a estratégia mais utilizada nos estudos para lidar com a não-resposta é a análise de casos completos, que é a estratégia padrão da maioria dos programas de análise estatística como o ambiente R⁹⁶ e Stata¹⁰⁴.

Quando lidamos com uma amostra grande o suficiente e os casos incompletos assumem um padrão de não-resposta completamente aleatórios, essa estratégia pode ser uma opção e não gerará estimativas enviesadas^{117,151}. Contudo, em amostras pequenas e quando o padrão de não-resposta não é aleatório, essa escolha pode enviesar os resultados e a validade do estudo pode ser comprometida.

De acordo com as análises descritas no Anexo II, o padrão de não-resposta em nossa amostra se enquadrou como não-resposta aleatória, ou seja, sem diferença sistemática entre os valores de não-resposta e os valores observados¹⁵¹. Apesar desse aspecto, a utilização da análise de casos completos reduziria o tamanho amostral em mais de 50% resultando na perda de poder estatístico e maior risco de superestimação dos benefícios e subestimação dos danos. A escolha de utilizar a IMEC se deu por seus benefícios frente à outras técnicas. A imputação múltipla, ao invés de substituir um único valor para cada dado ausente (imputação única), substitui cada valor ausente por um conjunto de valores plausíveis^{119,152}. É importante lembrar que a imputação múltipla não cria dados, o método simplesmente estima os valores ausentes utilizando os dados observados para que então possam ser analisados utilizando técnicas de análise de dados completos^{118,152}. A técnica além de restaurar a variabilidade natural dos dados, incorpora a incerteza dos dados ausentes, resultando em inferências estatísticas mais válidas^{153,154}. Além disso, a imputação múltipla é robusta à violação da premissa de normalidade dos dados e produz resultados adequados mesmo em amostras pequenas e com grande proporção de não-resposta^{153,154}.

A maior limitação, no entanto, foi o tamanho da amostra em si. Por se tratar de exame laboratorial de alto custo, foi possível analisar apenas uma pequena amostra do material coletado, o que influenciou a significância dos resultados encontrados.

Apenas no ano de 2019 nosso grupo conseguiu verba adicional para realizar análises de metilação das mais de 900 amostras biológicas coletadas. Pretendemos dessa forma, refazer as análises aqui apresentadas, uma vez que tivermos conseguido finalizar a parte laboratorial, já em andamento. Acreditamos que, ao utilizar uma amostra de quase 1000 crianças, teremos poder estatístico suficiente para comprovar a nossa hipótese, pois mesmo não obtendo resultados estatisticamente significantes (p -valor $> 0,05$), podemos observar que a amamentação tem associação positiva com os desfechos analisados neste estudo. Além de que ao aumentar o tamanho amostral, iremos conseguir estimar com maior precisão os efeitos reais das exposições nos desfechos e reduzindo a probabilidade de cometermos o erro do tipo II, ou seja, aceitamos a hipótese nula quando na realidade, ela deveria ser rejeitada^{148,149}.

8. CONCLUSÕES

Este estudo fornece evidências de que a aceleração da IG está associada a partos prematuros e características antropométricas do neonato, e que a associação com o desenvolvimento infantil ou a obesidade aos 3 anos não é estatisticamente significativa, mesmo quando a amamentação é inserida como fator moderador. Corrobora achados anteriores mostrando que o nível socioeconômico e estimulação da criança estão fortemente associadas ao melhor desenvolvimento infantil independentemente da idade gestacional epigenética, aceleração da IG ou amamentação. Estudos com maior amostragem, são necessários para entendermos os fatores por trás do relógio epigenético e sua associação com os desfechos ao nascer, desenvolvimento neurocognitivo e físico das crianças na população brasileira.

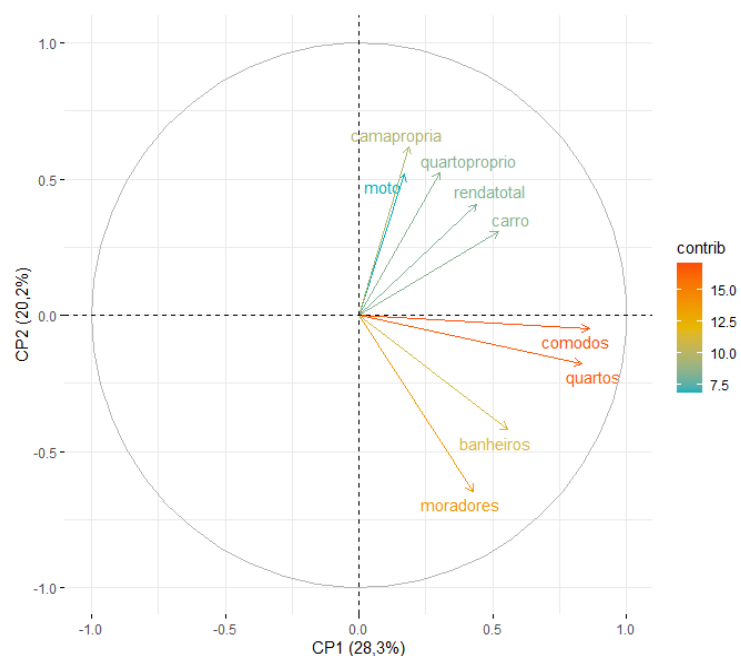
9. ANEXOS

ANEXO I

Análise de componente principal (ACP) e classificação do nível socioeconômica (SES)

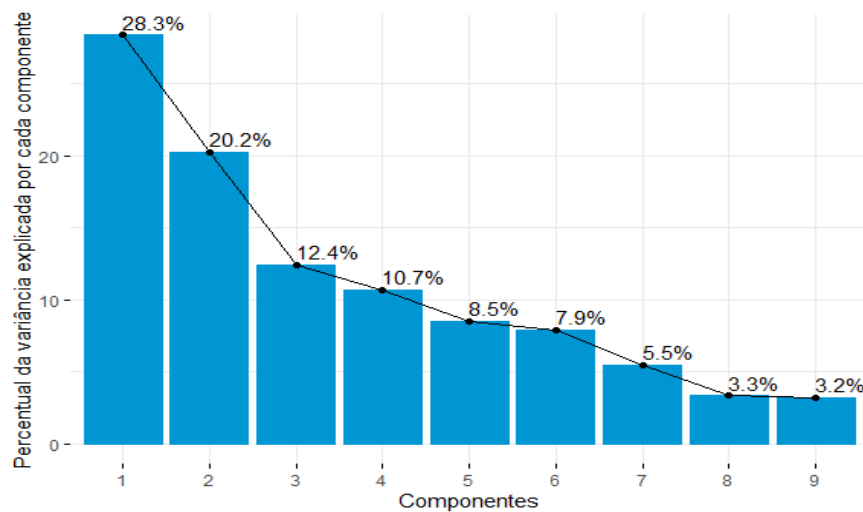
Preliminarmente às análises *per se*, aplicamos a ACP para agregar os dados referentes a posse de bens, renda familiar e infraestrutura do domicílio para construir uma variável única com um indicativo mais preciso da classificação SES do indivíduo. A **Figura A1** apresenta a matriz de correlação das variáveis utilizadas na composição do ACP e suas contribuições para a variação no primeiro e no segundo componente (CP).

Figura A1. Variáveis utilizadas na análise de componentes principais (ACP) e suas contribuições para a variação no primeiro e segundo componente principal (CP).



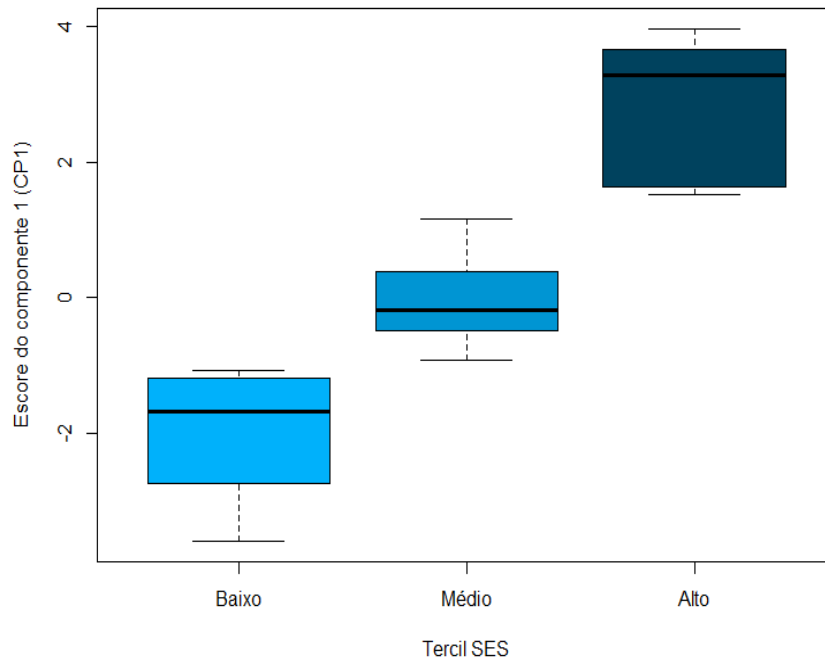
Cada CP possui um peso que é dado pelo autovalor da matriz de correlação, sendo ordenados de maneira que o primeiro CP explique a maior parte da variação dos dados originais (**Figura A2**).

Figura A2. Porcentagem de variação explicada por cada componente principal.



Após a aplicação do APC, o CP1 foi extraído e categorizado em tercís de intervalos iguais. A amostra então ficou distribuída em classificação SES: baixo (17,4% [-1,91 ± 0,85]); médio (51,4% [-0,05 ± 0,64]); e alto (12,9% [2,75 ± 1,07]), como mostrado na **Figura A3**. Entre esses, 18,6% dos dados estavam como não-resposta e foram imputados posteriormente para a análise de dados completa.

Figura A3. Distribuição dos tercis socioeconômicos (SES) de acordo com o escore do primeiro componente (CP1).



ANEXO II

Imputação Múltipla por Equações em Cadeia – IMEC

A análise preliminar descritiva para determinar a proporção e padrão de não-reposta é mostrada na **Tabela A1**. Nesta tabela são exibidos, em ordem decrescente, o percentual de valores de não-resposta para cada variável. De forma global 23,7% dos valores são de não-resposta, sendo o inventário HOME a variável com a maior proporção de valores faltantes (52,9%).

Na **Tabela A2** apresentamos os coeficientes de regressão do teste de Little. No teste de Little assumimos como H_0 que as variáveis descritas na **Tabela A1** possuem padrão de não-resposta aleatório e H_1 de que os dados possuem um padrão não-aleatório. Para o teste, as variáveis com não-resposta foram utilizadas como variáveis dependentes e as variáveis completas como independentes. No teste obtivemos χ^2 de 162,11 com 462 graus de liberdade e p-valor = 1,00. A partir dos resultados obtidos, podemos aceitar H_0 a um nível de significância de 5% de que os dados possuem padrão de não-resposta aleatórios.

Tabela A1. Padrão de não-resposta entre as variáveis utilizadas nas análises.

	% não-resposta	Tipo de variável
Avaliação ao nascer		
Idade gestacional epigenética (semanas)	0	Contínua
Idade gestacional (semanas)	0	Contínua
Aceleração da IG	0	Contínua
Aceleração residual da idade epigenética	0	Contínua
Sexo (feminino)	0	Binária
Peso ao nascer (kg)	0	Contínua
Raça materna	0	Catagórica
Idade materna no parto	0	Contínua
Comprimento ao nascer (cm)	2,9	Contínua
Escore-z peso-para-idade	2,9	Contínua
Escore-z comprimento-para-idade	2,9	Contínua
Educação materna	4,3	Catagórica
Avaliação aos 3 anos		
PRIDI	0	Contínua
Escore-z peso-para-idade	2,9	Contínua
Obesidade	4,3	Binária
Escore-z estatura-para-idade	4,3	Contínua
Escore-z peso-para-estatura	4,3	Contínua
Nível socioeconômico	18,6	Catagórica
Amamentação exclusiva	45,7	Contínua
Amamentação total	47,1	Contínua
Inventário HOME	52,9	Contínua

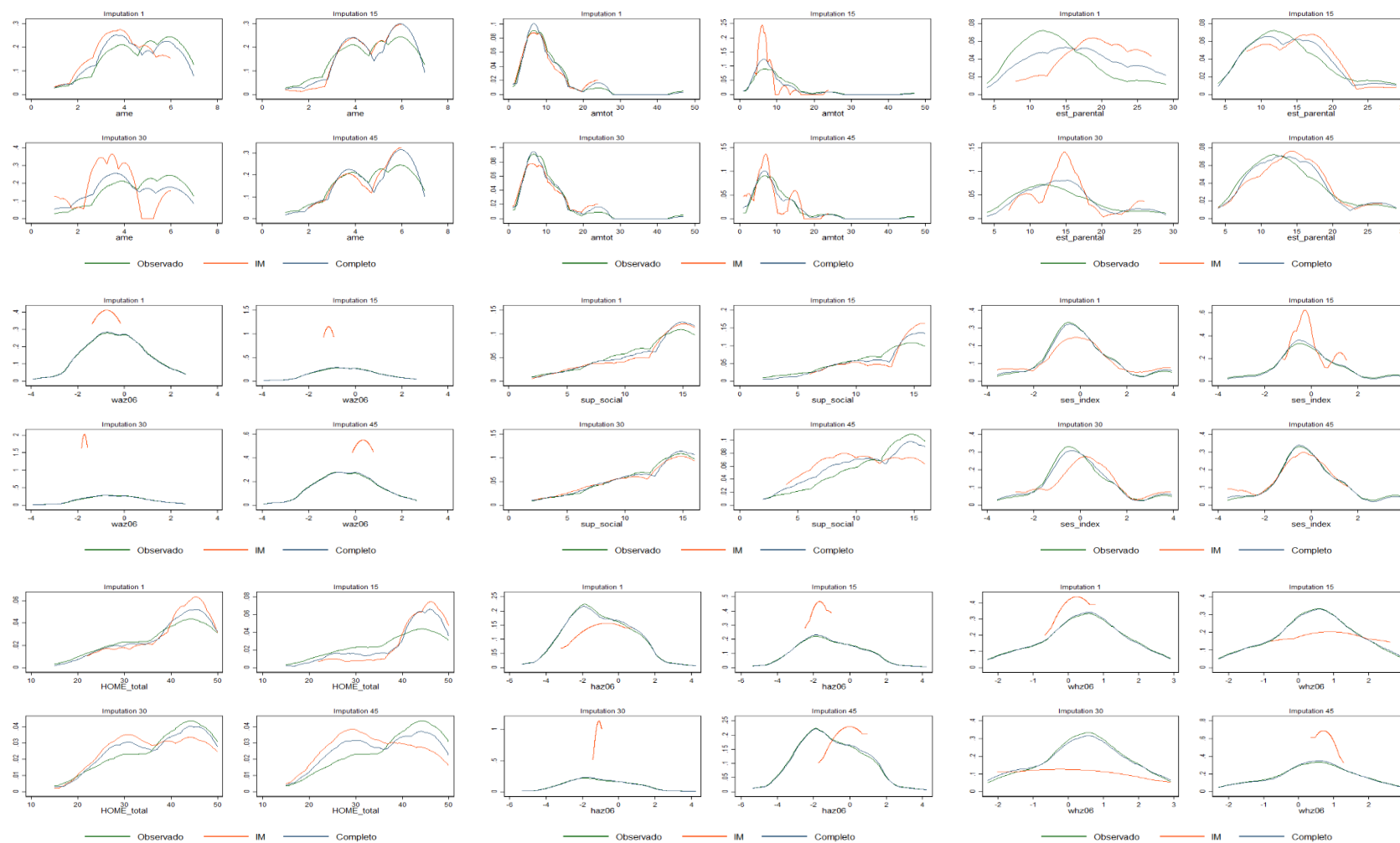
Tabela A2. Teste de Little e os coeficientes das estimativas da regressão linear multivariada das variáveis dependentes sobre as variáveis independentes e os valores de sigma (matriz de covariância).

Coefficientes											
	Escolaridade	EPI¹	PPI¹	SES	HOME	EPI²	PPI²	PPE²	Obesidade	AME	AM
Idade materna	0.00	-0.01	0.02	0.02	-0.02	-0.02	0.00	0.01	0.01	0.02	-0.02
Sexo	-0.09	-0.33	-0.10	0.11	9.04	0.34	0.55	0.56	0.15	0.36	8.85
Raça	-0.23	-0.03	-0.34	0.04	-5.76	0.54	0.03	-0.36	-0.08	0.01	-1.10
IG cronológica	-0.19	0.85	0.08	-0.36	12.26	0.30	0.35	0.27	0.08	-0.41	15.31
IG epigenética	-0.02	0.06	-0.05	-0.03	0.60	0.22	0.07	-0.11	-0.03	-0.29	0.57
PRIDI	0.13	-0.07	-0.09	0.17	9.00	0.18	0.28	0.25	0.04	0.72	3.59
Intercepto	3.23	-2.75	2.33	2.62	2.92	-10.75	-4.19	3.75	0.94	15.56	-34.53
Sigma											
Escolaridade	0.32	0.12	0.14	0.02	1.33	0.32	0.17	-0.04	0.00	0.08	1.64
EPI ¹	0.12	1.41	0.90	0.01	-1.63	0.75	0.52	0.11	0.02	0.09	1.10
PPI ¹	0.14	0.90	1.22	0.04	-1.36	0.29	0.32	0.23	0.04	-0.03	1.52
SES	0.02	0.01	0.04	0.31	2.21	-0.08	-0.02	0.04	-0.02	0.36	1.48
HOME	1.33	-1.63	-1.36	2.21	137.71	-1.41	-2.62	-2.55	-1.28	6.69	58.27
EPI ²	0.32	0.75	0.29	-0.08	-1.41	2.85	1.75	0.05	0.09	-0.66	3.78
PPI ²	0.17	0.52	0.32	-0.02	-2.62	1.75	1.65	0.87	0.22	-0.08	3.93
PPE ²	-0.04	0.11	0.23	0.04	-2.55	0.05	0.87	1.24	0.25	0.44	2.42
Obesidade	0.00	0.02	0.04	-0.02	-1.28	0.09	0.22	0.25	0.13	0.08	1.75
AME	0.08	0.09	-0.03	0.36	6.69	-0.66	-0.08	0.44	0.08	1.98	5.05
AM	1.64	1.10	1.52	1.48	58.27	3.78	3.93	2.42	1.75	5.05	83.30

EPI: Escore-z do comprimento/estatura-para-idade; **PPI:** Escore-z do peso-para-idade; **SES:** Nível socioeconômico; **HOME:** Escore do inventário HOME; **Social:** Escore de suporte social; **AME:** Amamentação exclusiva; **AM:** Amamentação total. ¹ Ao nascer; ² Acompanhamento aos 3 anos.

Assumindo o perfil de não-resposta como aleatório, prosseguimos para a imputação dos dados. A IMEC gera uma série de estimativas onde cada variável dependente é regredida sobre as demais, sendo que as interações acontecem de modo crescente, ou seja, a imputação se inicia com a variável com menor número de não-resposta utilizando apenas dados completos e repete a interação por todas as variáveis. A **Figura A4** compara graficamente as distribuições dos dados observados (linha verde), dados imputados (linha laranja) e dados completos (linha azul) para cada uma das variáveis com valores de não-respostas imputadas no modelo.

Figura A4. Densidade de probabilidade dos dados observados (linha verde), dos dados imputados (linha laranja) e dos dados completos (linha azul) nas cadeias 1, 15, 30 e 45 geradas por IMEC para as variáveis com valores de não-resposta.



ame: amamentação exclusiva; **amtot:** amamentação total; **est_parental:** estresse parental; **waz06:** peso-para-idade aos 36 meses; **sup_social:** suporte social; **ses_index:** index socioeconômico; **HOME_total:** escore de HOME; **haz06:** estatura-para-idade aos 36 meses; **whz06:** peso-para-estatura aos 36 meses.

Seguindo a fórmula de eficiência relativa (ER) de Rubin¹¹⁸: $ER = 1 / (1 + \frac{FMI}{m})$, onde *FMI* é a fração de não-resposta e *m* o número de imputes. Nossos dados possuem variáveis com mais de 50% de não-resposta, então nossa ER pode chegar a 91% com apenas 5 imputações, entretanto, com tão poucos valores, apesar da eficiência, os erros padrão são instáveis. Para endereçar esse problema, utilizamos as recomendações de Bodner¹⁵³ e Royston et al.¹¹⁹, que sugerem que o número de imputações deve ser similar a porcentagem de valores ausentes no banco de dados, em nosso caso entre 40 e 50 imputações. Seguindo esse critério, geramos 45 imputações.

A **Tabela A3** apresenta a comparação entre os modelos de Análise de Casos Completos (ACC) e IMEC nos desfechos PRIDI e Obesidade. Todos os modelos obtiveram uma ER maior que 99%, mesmo quando utilizamos a variável AM total. Essa foi a variável com maior FMI, resultando no aumento relativo da variância (RVI) de mais de 100% nos modelos de obesidade/IG epigenética e obesidade/aceleração da IG. Entretanto, podemos observar em todos os modelos de IMEC a redução no erro padrão e nos intervalos de confiança, o que demonstra menor variação da média amostral em relação à média da população se comparados aos modelos de ACC.

Na ACC podemos observar que amamentação exclusiva (AME) foi associada positivamente com PRIDI aos 3 anos, sendo que a cada mês a mais de AME temos um aumento de 0,30 DP no score de PRIDI (95%IC: 0,07-0,53; p=0,011) no modelo com idade gestacional epigenética (IGE). No modelo de ACC com aceleração da IG, a cada mês adicionado à AME, temos um aumento semelhante no score de PRIDI de 0,25 DP (95%IC: 0,02-0,48; p=0,031). Na ACC de amamentação (AM) total, obtivemos associações marginais entre as exposições IG epigenética e aceleração da IG e o desfecho PRIDI. Quando os mesmos modelos foram analisados com base na IMEC, não foi obtida nenhuma associação significativa entre as exposições analisadas

e o desfecho PRIDI. Para o desfecho Obesidade, não foi encontrada nenhuma associação entre as exposições nos modelos de ACC e de IMEC.

Tabela A3. Estimativa dos parâmetros por Análise de Casos Completos (ACC) e pelo método de Imputação Múltipla por Equações em Cadeia (IMEC).

Covariáveis	ACC ¹				IMEC ²				FMI	RVI
	β	Erro padrão	95%IC	<i>p</i> -valor	β	Erro padrão	95% IC	<i>p</i> -valor		
PRIDI – idade gestacional epigenética - amamentação exclusiva										
IGE (semanas)	0,18	0,10	-0,02 - 0,38	0,072	0,11	0,08	-0,05 - 0,26	0,173	0,02	0,02
AME (meses)	0,30	0,11	0,07 - 0,53	0,011	0,20	0,10	-0,01 - 0,42	0,061	0,39	0,61
Intercepto	-0,08	0,16	-0,40 - 0,40	0,608	0,00	0,12	-0,23 - 0,23	0,974	0,01	0,01
PRIDI – aceleração da IG – amamentação exclusiva										
AIG (semanas)	0,05	0,08	-0,12 - 0,23	0,535	0,04	0,06	-0,08 - 0,16	0,476	0,08	0,08
AME (meses)	0,25	0,11	0,02 - 0,48	0,031	0,19	0,10	-0,02 - 0,39	0,078	0,40	0,63
Intercepto	-0,10	0,17	-0,43 - 0,24	0,552	0,00	0,12	-0,23 - 0,24	0,977	0,21	0,26
PRIDI – idade gestacional epigenética – amamentação total										
IGE (semanas)	0,13	0,10	-0,07 - 0,33	0,199	0,08	0,08	-0,07 - 0,24	0,289	0,01	0,01
AM (meses)	0,04	0,02	-0,00 - 0,08	0,053	0,03	0,02	-0,00 - 0,07	0,135	0,26	0,34
Intercepto	-0,07	0,17	-0,41 - 0,27	0,678	0,00	0,12	-0,23 - 0,24	0,975	0,00	0,00
PRIDI – aceleração da IG – amamentação total										
AIG (semanas)	0,03	0,09	-0,15 - 0,20	0,748	0,04	0,06	-0,08 - 0,16	0,508	0,01	0,01
AM (meses)	0,04	0,02	-0,00 - 0,08	0,068	0,03	0,02	-0,01 - 0,06	0,148	0,25	0,32
Intercepto	-0,09	0,17	-0,44 - 0,26	0,603	0,00	0,11	-0,23 - 0,23	0,976	0,00	0,00

(Continua)

¹ Casos completos: PRIDI/AME: n = 38; PRIDI/AM: n = 37; Obesidade/AME: 36; Obesidade/AM: 35.² IMEC: n = 70.

(Conclusão)

Tabela A3. Estimativa dos parâmetros por Análise de Casos Completos (ACC) e pelo método de Imputação Múltipla por Equações em Cadeia (IMEC).

Covariáveis	ACC ¹				IMEC ²				FMI	RVI
	β	Erro padrão	95%IC	<i>p</i> -valor	β	Erro padrão	95% IC	<i>p</i> -valor		
Obesidade – idade gestacional epigenética – amamentação exclusiva										
IGE (semanas)	0,27	0,47	-0,65 - 1,18	0,568	-0,09	0,22	-0,53 - 0,35	0,692	0,08	0,09
AME (meses)	-0,26	0,42	-1,09 - 0,57	0,538	-0,17	0,35	-0,85 - 0,51	0,633	0,56	1,22
Intercepto	-2,50	0,67	-3,82 - -1,19	0,000	-1,69	0,35	-2,38 - -0,99	0,000	0,06	0,07
Obesidade – aceleração da IG – amamentação exclusiva										
AIG (semanas)	-0,24	0,36	-0,94 - 0,47	0,511	-0,12	0,18	-0,47 - 0,23	0,508	0,04	0,04
AME (meses)	-0,39	0,40	-1,17 - 0,40	0,332	-0,15	0,33	-0,81 - 0,51	0,648	0,54	1,14
Intercepto	-2,68	0,77	-4,19 - -1,17	0,001	-1,70	0,36	-2,39 - -1,00	0,000	0,06	0,13
Obesidade – idade gestacional epigenética – amamentação total										
IGE	0,39	0,47	-0,54 - 1,30	0,417	-0,07	0,21	-0,48 - 0,35	0,753	0,03	0,03
AM (meses)	0,03	0,06	-0,09 - 0,14	0,630	-0,01	0,06	-0,12 - 0,11	0,933	0,33	0,47
Intercepto	-2,44	0,66	-3,73 - -1,15	0,000	-1,64	0,34	-2,31 - -0,97	0,000	0,05	0,06
Obesidade – aceleração da IG – amamentação total										
AIG	-0,16	0,31	-0,76 - 0,44	0,593	-0,12	0,17	-0,45 - 0,21	0,483	0,03	0,03
AM (meses)	0,03	0,06	-0,09 - 0,15	0,624	-0,00	0,06	-0,12 - 0,12	0,956	0,33	0,50
Intercepto	-2,52	0,69	-3,87 - -1,16	0,000	-1,65	0,34	-2,33 - -0,98	0,000	0,05	0,06

IMEC: Imputação por equações em cadeia; **ACC:** Análise de casos completos; **IGE:** idade gestacional epigenética; **AME:** amamentação exclusiva; **AIE:** aceleração da IG; **AM:** amamentação total; **β :** beta; **IC:** intervalo de confiança; **FMI:** fração de dados faltantes; **RVI:** aumento relativo da variância.

¹ Casos completos: PRIDI/AME: n = 38; PRIDI/AM: n = 37; Obesidade/AME: 36; Obesidade/AM: 35.

² IMEC: n = 70.

ANEXO III

Análise bivariada entre os desfechos escore-z de PRIDI e Obesidade infantil.

Tabela A4. Análise bivariada entre os desfechos escore-z de PRIDI e Obesidade infantil e covariáveis após imputação múltipla por equações em cadeia.

Variáveis	n	PRIDI	Obesidade
		β (erro padrão) <i>p</i> -valor	β (erro padrão) <i>p</i> -valor
Sexo	70	0,08 (0,24) 0,754	*
Escore-z peso-para-idade ao nascer	70	-0,07 (0,10) 0,484	-0,02 (0,29) 0,935
Escore-z peso-para-comprimento ao nascer	70	-0,06 (0,11) 0,579	0,19 (0,32) 0,559
Idade materna (anos)	70	-0,03 (0,02) 0,090	0,03 (0,05) 0,466
Escolaridade materna	70	0,25 (0,21) 0,232	-0,02 (0,59) 0,974
Raça	70	0,13 (0,24) 0,590	-0,70 (0,68) 0,301
Nível socioeconômico	70	0,32 (0,16) 0,044	-0,01 (0,43) 0,980
Idade da criança (meses)	70	-0,03 (0,03) 0,331	-0,02 (0,08) 0,811
Déficit de crescimento	70	-0,22 (0,26) 0,392	-1,71 (1,09) 0,114
Inventário HOME	70	0,04 (0,02) 0,023	-0,05 (0,05) 0,350

* Variável baseada no escore-z de peso-para-estatura que já corrige para sexo.

10.REFERÊNCIAS

1. Shonkoff JP, Richter L, van der Gaag J, Bhutta ZA. An Integrated Scientific Framework for Child Survival and Early Childhood Development. *Pediatrics*. 2012;129(2):e460-e472. doi:10.1542/peds.2011-0366
2. Black MM, Walker SP, Fernald LCH, et al. Early childhood development coming of age: science through the life course. *Lancet*. 2017;389(10064):77-90. doi:10.1016/S0140-6736(16)31389-7
3. Comitê Científico do Núcleo Ciência Pela Infância. *Estudo Nº V: Impactos Da Estratégia Saúde Da Família e Desafios Para o Desenvolvimento Infantil.*; 2019. https://ncpi.org.br/wp-content/uploads/2020/03/NCPI-WP_5.pdf
4. GINI index (World Bank estimate). data.worldbank.org/indicator/SI.POV.GINI
5. Osmond C, Barker DJP. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ Health Perspect*. 2000;108(suppl 3):545-553. doi:10.1289/ehp.00108s3545
6. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of In Utero and Early-Life Conditions on Adult Health and Disease. *N Engl J Med*. 2008;359(1):61-73. doi:10.1056/NEJMra0708473
7. Hoffman DJ, Reynolds RM, Hardy DB. Developmental origins of health and disease: current knowledge and potential mechanisms. *Nutr Rev*. 2017;75(12):951-970. doi:10.1093/nutrit/nux053
8. Walker SP, Wachs TD, Meeks Gardner J, et al. Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries. *Lancet*. 2007;369(9556):145-157. doi:10.1016/S0140-6736(07)60076-2
9. Shonkoff JP, Garner AS, Siegel BS, et al. The Lifelong Effects of Early Childhood Adversity and Toxic Stress. *Pediatrics*. 2012;129(1):e232-e246. doi:10.1542/peds.2011-2663
10. *World Health Organization, United Nations Children's Fund, World Bank Group. Nurturing Care for Early Childhood Development: A Framework for Helping Children Survive and Thrive to Transform Health and Human Potential. Geneva: World Health Organization; 20.*

11. van IJzendoorn MH, Bakermans-Kranenburg MJ, Ebstein RP. Methylation Matters in Child Development: Toward Developmental Behavioral Epigenetics. *Child Dev Perspect*. 2011;5(4):305-310. doi:10.1111/j.1750-8606.2011.00202.x
12. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ*. 1995;311(6998):171-174. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7613432>
13. World Health Organization. *Essential Nutrition Actions: Improving Maternal, Newborn, Infant and Young Child Health and Nutrition*. World Health Organization; 2013. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/84409/9789241505550_eng.pdf?sequence=1
14. World Health Organization (WHO). *WHO Child Growth Standards: Length/Height-for-Age, Weight-for-Age, Weight-for-Length, Weight-for-Height and Body Mass Index-for-Age: Methods and Development*. Geneva: World Health Organization; 2006. https://www.who.int/childgrowth/standards/technical_report/en/
15. Monteiro CA, Benicio MHD, Conde WL, et al. Narrowing socioeconomic inequality in child stunting: the Brazilian experience, 1974–2007. *Bull World Health Organ*. 2010;88(4):305-311. doi:10.2471/BLT.09.069195
16. World Health Organization. Facts and figures on childhood obesity: Commission on Ending Childhood Obesity. <http://www.who.int/end-childhood-obesity/facts/en/>
17. FAO; OPS/WHO. *Panorama de La Seguridad Alimentaria y Nutricional En América Latina y El Caribe*.; 2017. <http://www.fao.org/3/a-i6747s.pdf>
18. World Health Organization. *Report of the Commission on Ending Childhood Obesity: Implementation Plan: Executive Summary*. World Health Organization; 2017. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259349>
19. Black MM, Aboud FE. Responsive feeding is embedded in a Theoretical Framework of responsive parenting. *J Nutr*. 2011;141(3):490-494. doi:10.3945/jn.110.129973
20. Victora CG, Bahl R, Barros AJD, et al. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet*. 2016;387(10017):475-490. doi:10.1016/S0140-6736(15)01024-7
21. Horta BL, Victora CG, Organization WH. Short-term effects of breastfeeding: a systematic review on the benefits of breastfeeding on diarrhoea and pneumonia mortality. Published online 2013.
22. Victora CG, Horta BL, de Mola CL, et al. Association between breastfeeding and intelligence, educational attainment, and income at 30 years of age: a prospective birth cohort study from Brazil. *Lancet Glob Heal*. 2015;3(4):e199-e205. doi:10.1016/S2214-109X(15)70002-1

23. Horta BL, Victora CG. Long-term effects of breastfeeding. *World Heal Organ*. Published online 2013.
24. Brasil. Saúde da criança: aleitamento materno e alimentação complementar. *Ministério da Saúde*. Published online 2015.
25. Boccolini CS, Boccolini PDMM, Monteiro FR, Venâncio SI, Giugliani ERJ. Breastfeeding indicators trends in Brazil for three decades. *Rev Saude Publica*. 2017;51:108. doi:10.11606/S1518-8787.2017051000029
26. Ballard O, Morrow AL. Human Milk Composition. *Pediatr Clin North Am*. 2013;60(1):49-74. doi:10.1016/j.pcl.2012.10.002
27. Mischke M, Plosch T. More than just a gut instinct-the potential interplay between a baby's nutrition, its gut microbiome, and the epigenome. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 2013;304(12):R1065-R1069. doi:10.1152/ajpregu.00551.2012
28. Obermann-Borst SA, Eilers PHC, Tobi EW, et al. Duration of breastfeeding and gender are associated with methylation of the LEPTIN gene in very young children. *Pediatr Res*. 2013;74(3):344-349. doi:10.1038/pr.2013.95
29. Verduci E, Banderali G, Barberi S, et al. Epigenetic effects of human breast milk. *Nutrients*. 2014;6(4):1711-1724. doi:10.3390/nu6041711
30. Brion M-JA, Lawlor DA, Matijasevich A, et al. What are the causal effects of breastfeeding on IQ, obesity and blood pressure? Evidence from comparing high-income with middle-income cohorts. *Int J Epidemiol*. 2011;40(3):670-680. doi:10.1093/ije/dyr020
31. Robinson SM. Infant nutrition and lifelong health: current perspectives and future challenges. *J Dev Orig Health Dis*. 2015;6(5):384-389. doi:10.1017/S2040174415001257
32. Waddington CH. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*. 1942;150(3811):563-565.
33. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16(1):6-21. doi:10.1101/gad.947102
34. Boersma GJ, Bale TL, Casanello P, et al. Long-Term Impact of Early Life Events on Physiology and Behaviour. *J Neuroendocrinol*. 2014;26(9):587-602. doi:10.1111/jne.12153
35. Nilsson E, Ling C. DNA methylation links genetics, fetal environment, and an unhealthy lifestyle to the development of type 2 diabetes. *Clin Epigenetics*. 2017;9(1):105. doi:10.1186/s13148-017-0399-2
36. Rakyan VK, Down TA, Balding DJ, Beck S. Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nat Rev Genet*. 2011;12(8):529-541. doi:10.1038/nrg3000

37. Relton CL, Hartwig FP, Davey Smith G. From stem cells to the law courts: DNA methylation, the forensic epigenome and the possibility of a biosocial archive. *Int J Epidemiol.* 2015;44(4):1083-1093. doi:10.1093/ije/dyv198
38. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013;14(10):R115. doi:10.1186/gb-2013-14-10-r115
39. Jung M, Pfeifer GP. Aging and DNA methylation. *BMC Biol.* 2015;13(1):7. doi:10.1186/s12915-015-0118-4
40. Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, et al. Aging and Environmental Exposures Alter Tissue-Specific DNA Methylation Dependent upon CpG Island Context. Schübeler D, ed. *PLoS Genet.* 2009;5(8):e1000602. doi:10.1371/journal.pgen.1000602
41. Rakyan VK, Down TA, Maslau S, et al. Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Res.* 2010;20(4):434-439. doi:10.1101/gr.103101.109
42. Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A, et al. Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer. *Genome Res.* 2010;20(4):440-446. doi:10.1101/gr.103606.109
43. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013;14(10):R115. doi:10.1186/gb-2013-14-10-r115
44. Marioni RE, Shah S, McRae AF, et al. DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biol.* 2015;16(1):25. doi:10.1186/s13059-015-0584-6
45. Christiansen L, Lenart A, Tan Q, et al. DNA methylation age is associated with mortality in a longitudinal Danish twin study. *Aging Cell.* 2016;15(1):149-154. doi:10.1111/accel.12421
46. Horvath S, Pirazzini C, Bacalini MG, et al. Decreased epigenetic age of PBMCs from Italian semi-supercentenarians and their offspring. *Aging (Albany NY).* 2015;7(12):1159-1170. doi:10.18632/aging.100861
47. Levine ME, Lu AT, Chen BH, et al. Menopause accelerates biological aging. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(33):9327-9332. doi:10.1073/pnas.1604558113
48. Marioni RE, Shah S, McRae AF, et al. The epigenetic clock is correlated with physical and cognitive fitness in the Lothian Birth Cohort 1936. *Int J Epidemiol.* 2015;44(4):1388-1396. doi:10.1093/ije/dyu277
49. Levine ME, Lu AT, Bennett DA, Horvath S. Epigenetic age of the pre-frontal cortex is associated with neuritic plaques, amyloid load, and Alzheimer's disease related cognitive functioning. *Aging (Albany NY).* 2015;7(12):1198-1211. doi:10.18632/aging.100864

50. Horvath S, Erhart W, Brosch M, et al. Obesity accelerates epigenetic aging of human liver. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(43):15538-15543. doi:10.1073/pnas.1412759111
51. Nevalainen T, Kananen L, Marttila S, et al. Obesity accelerates epigenetic aging in middle-aged but not in elderly individuals. *Clin Epigenetics*. 2017;9(1):20. doi:10.1186/s13148-016-0301-7
52. Barker DJP. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med*. 2007;261(5):412-417. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x
53. Wadhwa P, Buss C, Entringer S, Swanson J. Developmental Origins of Health and Disease: Brief History of the Approach and Current Focus on Epigenetic Mechanisms. *Semin Reprod Med*. 2009;27(05):358-368. doi:10.1055/s-0029-1237424
54. Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab*. 2004;15(4):183-187. doi:10.1016/j.tem.2004.03.002
55. Hanson M, Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD. Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: Theoretical considerations and epigenetic mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol*. 2011;106(1):272-280. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2010.12.008
56. Entringer S, Buss C, Swanson JM, et al. Fetal Programming of Body Composition, Obesity, and Metabolic Function: The Role of Intrauterine Stress and Stress Biology. *J Nutr Metab*. 2012;2012:1-16. doi:10.1155/2012/632548
57. Gluckman PD, Low FM, Buklijas T, Hanson MA, Beedle AS. How evolutionary principles improve the understanding of human health and disease. *Evol Appl*. 2011;4(2):249-263. doi:10.1111/j.1752-4571.2010.00164.x
58. Teune MJ, Bakhuizen S, Gyamfi Bannerman C, et al. A systematic review of severe morbidity in infants born late preterm. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;205(4):374.e1-374.e9. doi:10.1016/j.ajog.2011.07.015
59. Young PC, Glasgow TS, Li X, Guest-Warnick G, Stoddard G. Mortality of Late-Preterm (Near-Term) Newborns in Utah. *Pediatrics*. 2007;119(3):e659-e665. doi:10.1542/peds.2006-2486
60. Yang S, Platt RW, Kramer MS. Variation in Child Cognitive Ability by Week of Gestation Among Healthy Term Births. *Am J Epidemiol*. 2010;171(4):399-406. doi:10.1093/aje/kwp413
61. Hansen AK, Wisborg K, Uldbjerg N, Henriksen TB. Risk of respiratory morbidity in term infants delivered by elective caesarean section: cohort study. *BMJ*. 2008;336(7635):85-87. doi:10.1136/bmj.39405.539282.BE

62. Parets SE, Conneely KN, Kilaru V, et al. Fetal DNA Methylation Associates with Early Spontaneous Preterm Birth and Gestational Age. Zakar T, ed. *PLoS One*. 2013;8(6):e67489. doi:10.1371/journal.pone.0067489
63. Schroeder JW, Conneely KN, Cubells JF, et al. Neonatal DNA methylation patterns associate with gestational age. *Epigenetics*. 2011;6(12):1498-1504. doi:10.4161/epi.6.12.18296
64. Simpkin AJ, Suderman M, Gaunt TR, et al. Longitudinal analysis of DNA methylation associated with birth weight and gestational age. *Hum Mol Genet*. 2015;24(13):3752-3763. doi:10.1093/hmg/ddv119
65. Knight AK, Craig JM, Theda C, et al. An epigenetic clock for gestational age at birth based on blood methylation data. *Genome Biol*. 2016;17(1):206. doi:10.1186/s13059-016-1068-z
66. Girchenko P, Lahti J, Czamara D, et al. Associations between maternal risk factors of adverse pregnancy and birth outcomes and the offspring epigenetic clock of gestational age at birth. *Clin Epigenetics*. 2017;9(1):49. doi:10.1186/s13148-017-0349-z
67. Suarez A, Lahti J, Czamara D, et al. The Epigenetic Clock at Birth: Associations With Maternal Antenatal Depression and Child Psychiatric Problems. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2018;57(5):321-328.e2. doi:10.1016/j.jaac.2018.02.011
68. Bright HD, Howe LD, Khouja JN, Simpkin AJ, Suderman M, O'Keeffe LM. Epigenetic gestational age and trajectories of weight and height during childhood: a prospective cohort study. *Clin Epigenetics*. 2019;11(1):194. doi:10.1186/s13148-019-0761-7
69. Simpkin AJ, Howe LD, Tilling K, et al. The epigenetic clock and physical development during childhood and adolescence: longitudinal analysis from a UK birth cohort. *Int J Epidemiol*. 2017;46(2):dyw307. doi:10.1093/ije/dyw307
70. Hartwig FP, Loret de Mola C, Davies NM, Victora CG, Relton CL. Breastfeeding effects on DNA methylation in the offspring: A systematic literature review. Tost J, ed. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173070. doi:10.1371/journal.pone.0173070
71. Hartwig FP, Smith GD, Simpkin AJ, Victora CG, Relton CL, Caramaschi D. Association between breastfeeding and DNA methylation over the life course: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *bioRxiv*. Published online January 1, 2019:800722. doi:10.1101/800722
72. Sherwood WB, Bion V, Lockett GA, et al. Duration of breastfeeding is associated with leptin (LEP) DNA methylation profiles and BMI in 10-year-old children. *Clin Epigenetics*. 2019;11(1):128. doi:10.1186/s13148-019-0727-9
73. Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD, Hanson MA. Epigenetic Mechanisms and the Mismatch Concept of the Developmental Origins of Health and

- Disease. *Pediatr Res.* 2007;61(5 Part 2):5R-10R. doi:10.1203/pdr.0b013e318045bedb
74. Gluckman PD, Hanson MA, Mitchell MD. Developmental origins of health and disease: reducing the burden of chronic disease in the next generation. *Genome Med.* 2010;2(2):14. doi:10.1186/gm135
75. Waterland RA, Michels KB. Epigenetic Epidemiology of the Developmental Origins Hypothesis. *Annu Rev Nutr.* 2007;27(1):363-388. doi:10.1146/annurev.nutr.27.061406.093705
76. Micha R, Mozaffarian D. Saturated Fat and Cardiometabolic Risk Factors, Coronary Heart Disease, Stroke, and Diabetes: a Fresh Look at the Evidence. *Lipids.* 2010;45(10):893-905. doi:10.1007/s11745-010-3393-4
77. McCann JC, Ames BN. Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(2):281-295. doi:10.1093/ajcn.82.2.281
78. Innis SM. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain Res.* 2008;1237:35-43. doi:10.1016/j.brainres.2008.08.078
79. Koletzko B, Lien E, Agostoni C, et al. The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *J Perinat Med.* 2008;36(1). doi:10.1515/JPM.2008.001
80. Guesnet P, Alessandri J-M. Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) – Implications for dietary recommendations. *Biochimie.* 2011;93(1):7-12. doi:10.1016/j.biochi.2010.05.005
81. Leventakou V, Roumeliotaki T, Koutra K, et al. Breastfeeding duration and cognitive, language and motor development at 18 months of age: Rhea mother-child cohort in Crete, Greece. *J Epidemiol Community Health.* 2015;69(3):232-239. doi:10.1136/jech-2013-202500
82. Marszalek JR, Lodish HF. Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21(1):633-657. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120624
83. Sharma AM, Staels B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Adipose Tissue—Understanding Obesity-Related Changes in Regulation of Lipid and Glucose Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(2):386-395. doi:10.1210/jc.2006-1268
84. Khot V, Chavan-Gautam P, Joshi S. Proposing interactions between maternal phospholipids and the one carbon cycle: A novel mechanism influencing the risk for cardiovascular diseases in the offspring in later life. *Life Sci.* 2015;129:16-21. doi:10.1016/j.lfs.2014.09.026

85. Caspi A, Williams B, Kim-Cohen J, et al. Moderation of breastfeeding effects on the IQ by genetic variation in fatty acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(47):18860-18865. doi:10.1073/pnas.0704292104
86. Steer CD, Davey Smith G, Emmett PM, Hibbeln JR, Golding J. FADS2 Polymorphisms Modify the Effect of Breastfeeding on Child IQ. Penha-Goncalves C, ed. *PLoS One*. 2010;5(7):e11570. doi:10.1371/journal.pone.0011570
87. Mook-Kanamori DO, Steegers EAP, Uitterlinden AG, et al. Breast-Feeding Modifies the Association of PPAR 2 Polymorphism Pro12Ala With Growth in Early Life: The Generation R Study. *Diabetes*. 2009;58(4):992-998. doi:10.2337/db08-1311
88. Verier C, Meirhaeghe A, Bokor S, et al. Breast-Feeding Modulates the Influence of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- (PPARG2) Pro12Ala Polymorphism on Adiposity in Adolescents: The Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence (HELENA) cross-sectional study. *Diabetes Care*. 2010;33(1):190-196. doi:10.2337/dc09-1459
89. Horta BL, Loret de Mola C, Victora CG. Long-term consequences of breastfeeding on cholesterol, obesity, systolic blood pressure and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr*. 2015;104(1):30-37. doi:10.1111/apa.13133
90. Simpkin AJ, Hemani G, Suderman M, et al. Prenatal and early life influences on epigenetic age in children: a study of mother-offspring pairs from two cohort studies. *Hum Mol Genet*. 2016;25(1):191-201. doi:10.1093/hmg/ddv456
91. Brentani A, Scoleze Ferrer AP, Brentani H, et al. Cohort profile: São Paulo Western Region Birth Cohort (ROC). *Int J Epidemiol*. Published online October 13, 2020. doi:10.1093/ije/dyaa129
92. Maschietto M, Bastos LC, Tahira AC, et al. Sex differences in DNA methylation of the cord blood are related to sex-bias psychiatric diseases. *Sci Rep*. 2017;7:44547. doi:10.1038/srep44547
93. Oros Klein K, Grinek S, Bernatsky S, et al. funtooNorm: an R package for normalization of DNA methylation data when there are multiple cell or tissue types. *Bioinformatics*. 2016;32(4):593-595. doi:10.1093/bioinformatics/btv615
94. Bakulski KM, Feinberg JI, Andrews S V., et al. DNA methylation of cord blood cell types: Applications for mixed cell birth studies. *Epigenetics*. 2016;11(5):354-362. doi:10.1080/15592294.2016.1161875
95. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*. 2014;30(10):1363-1369. doi:10.1093/bioinformatics/btu049

96. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Published online 2019. <http://www.r-project.org/>
97. Verdisco A, Cueto S, Thompson J, Neuschmidt O. *Urgency and Possibility: First Initiative of Comparative Data on Child Development in Latin America*. Palgrave Macmillan; 2015. doi:10.1057/9781137305169.0009
98. Grisi SJFE, Escobar AM de U, Gomes FM da S. Desenvolvimento Cognitivo Adaptativo. In: *Desenvolvimento Da Criança*. 1st ed. Editora Atheneu; 2018:238.
99. Wilks T, Gerber RJ, Erdie-Lalena C. Developmental Milestones: Cognitive Development. *Pediatr Rev*. 2010;31(9):364-367. doi:10.1542/pir.31-9-364
100. Cohen J, Onunaku N, Clothier S, Poppe J. Helping Young Children Succeed Strategies to Promote Early Childhood Social and Emotional Development. Published online January 1, 2005.
101. Gerber RJ, Wilks T, Erdie-Lalena C. Developmental Milestones: Motor Development. *Pediatr Rev*. 2010;31(7):267-277. doi:10.1542/pir.31-7-267
102. Li R, Scanlon KS, Serdula MK. The Validity and Reliability of Maternal Recall of Breastfeeding Practice. *Nutr Rev*. 2005;63(4):103-110. doi:10.1111/j.1753-4887.2005.tb00128.x
103. Greiner T. Exclusive breastfeeding: measurement and indicators. *Int Breastfeed J*. 2014;9(1):18. doi:10.1186/1746-4358-9-18
104. StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP.
105. Hackman DA, Farah MJ. Socioeconomic status and the developing brain. *Trends Cogn Sci*. 2009;13(2):65-73. doi:10.1016/j.tics.2008.11.003
106. Piccolo L da R, Arteche AX, Fonseca RP, Grassi-Oliveira R, Salles JF. Influence of family socioeconomic status on IQ, language, memory and executive functions of Brazilian children. *Psicol Reflexão e Crítica*. 2016;29(1):23. doi:10.1186/s41155-016-0016-x
107. Black RE, Victora CG, Walker SP, et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet*. 2013;382(9890):427-451. doi:10.1016/S0140-6736(13)60937-X
108. Gibbs BG, Forste R. Socioeconomic status, infant feeding practices and early childhood obesity. *Pediatr Obes*. 2014;9(2):135-146. doi:10.1016/j.tics.2008.11.003
109. Vyas S, Kumaranayake L. Constructing socio-economic status indices: how to use principal components analysis. *Health Policy Plan*. 2006;21(6):459-468. doi:10.1093/heapol/czl029

110. Girchenko P, Lahti J, Czamara D, et al. Associations between maternal risk factors of adverse pregnancy and birth outcomes and the offspring epigenetic clock of gestational age at birth. *Clin Epigenetics*. 2017;9(1):49. doi:10.1186/s13148-017-0349-z
111. KING AR. Family environment scale predictors of academic performance. *Psychol Rep*. 1998;83(7):1319. doi:10.2466/PRO.83.7.1319-1327
112. Reynolds AJ. A structural model of first-grade outcomes for an urban, low socioeconomic status, minority population. *J Educ Psychol*. 1989;81(4):594-603. doi:10.1037/0022-0663.81.4.594
113. Stevenson DL, Baker DP. The Family-School Relation and the Child's School Performance. *Child Dev*. 1987;58(5):1348. doi:10.2307/1130626
114. Bradley RH, Caldwell BM, Rock SL, Ramey CT, et al. Home environment and cognitive development in the first 3 years of life: A collaborative study involving six sites and three ethnic groups in North America. *Dev Psychol*. 1989;25(2):217-235. doi:10.1037/0012-1649.25.2.217
115. Ronfani L, Vecchi Brumatti L, Mariuz M, et al. The Complex Interaction between Home Environment, Socioeconomic Status, Maternal IQ and Early Child Neurocognitive Development: A Multivariate Analysis of Data Collected in a Newborn Cohort Study. Gorlova OY, ed. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127052. doi:10.1371/journal.pone.0127052
116. Totsika V, Sylva K. The home observation for measurement of the environment revisited. *Child Adolesc Ment Health*. 2004;9(1):25-35.
117. Sterne JAC, White IR, Carlin JB, et al. Multiple imputation for missing data in epidemiological and clinical research: potential and pitfalls. *BMJ*. 2009;338(jun29 1):b2393-b2393. doi:10.1136/bmj.b2393
118. Rubin DB. Multiple imputation for survey nonresponse. Published online 1987.
119. White IR, Royston P, Wood AM. Multiple imputation using chained equations: Issues and guidance for practice. *Stat Med*. 2011;30(4):377-399. doi:10.1002/sim.4067
120. Baron RM, Kenny DA. The moderator–mediator variable distinction in social psychological research: Conceptual, strategic, and statistical considerations. *J Pers Soc Psychol*. 1986;51(6):1173.
121. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(5):1344S-1352S. doi:10.1093/ajcn/71.5.1344s
122. World Health Organization. *Global Nutrition Targets 2025: Low Birth Weight Policy Brief*. World Health Organization, 2014. World Health Organization https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/149020/WHO_NMH_NHD_14.5_eng.pdf

?ua=1

123. Blencowe H, Krasevec J, de Onis M, et al. National, regional, and worldwide estimates of low birthweight in 2015, with trends from 2000: a systematic analysis. *Lancet Glob Heal.* 2019;7(7):e849-e860. doi:10.1016/S2214-109X(18)30565-5
124. Khouja JN, Simpkin AJ, O’Keeffe LM, et al. Epigenetic gestational age acceleration: a prospective cohort study investigating associations with familial, sociodemographic and birth characteristics. *Clin Epigenetics.* 2018;10(1):86. doi:10.1186/s13148-018-0520-1
125. Bohlin J, Håberg SE, Magnus P, et al. Prediction of gestational age based on genome-wide differentially methylated regions. *Genome Biol.* 2016;17(1). doi:10.1186/s13059-016-1063-4
126. Knight AK, Smith AK, Conneely KN, et al. Relationship between Epigenetic Maturity and Respiratory Morbidity in Preterm Infants. *J Pediatr.* 2018;198:168-173.e2. doi:10.1016/j.jpeds.2018.02.074
127. Everson TM, Marsit CJ, Michael O’Shea T, et al. Epigenome-wide Analysis Identifies Genes and Pathways Linked to Neurobehavioral Variation in Preterm Infants. *Sci Rep.* 2019;9(1):6322. doi:10.1038/s41598-019-42654-4
128. Suarez A, Lahti J, Czamara D, et al. The epigenetic clock and pubertal, neuroendocrine, psychiatric, and cognitive outcomes in adolescents. *Clin Epigenetics.* 2018;10(1):96. doi:10.1186/s13148-018-0528-6
129. de Toro-Martín J, Guénard F, Tchernof A, et al. Body mass index is associated with epigenetic age acceleration in the visceral adipose tissue of subjects with severe obesity. *Clin Epigenetics.* 2019;11(1):172. doi:10.1186/s13148-019-0754-6
130. Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD, Hanson MA. Non-Imprinted Epigenetics in Fetal and Postnatal Development and Growth. In: *Nestle Nutrition Institute Workshop Series.* Vol 71. ; 2013:57-63. doi:10.1159/000342552
131. Richmond RC, Simpkin AJ, Woodward G, et al. Prenatal exposure to maternal smoking and offspring DNA methylation across the lifecourse: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Hum Mol Genet.* 2015;24(8):2201-2217. doi:10.1093/hmg/ddu739
132. Sherwood WB, Kothalawala DM, Kadalayil L, et al. Epigenome-Wide Association Study Reveals Duration of Breastfeeding Is Associated with Epigenetic Differences in Children. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(10):3569. doi:10.3390/ijerph17103569
133. Wallenborn JT., Levine; GA, Santos; AC dos, Grisi; S, Brentani; A, Fink G. Breastfeeding, Physical Growth, and Cognitive Development: Evidence From a Middle Income Country [Unpublished].

134. Ventura AK. Associations between Breastfeeding and Maternal Responsiveness: A Systematic Review of the Literature. *Adv Nutr An Int Rev J.* 2017;8(3):495-510. doi:10.3945/an.116.014753
135. Britto PR, Lye SJ, Proulx K, et al. Nurturing care: promoting early childhood development. *Lancet.* 2017;389(10064):91-102. doi:10.1016/S0140-6736(16)31390-3
136. Brown A, Arnott B. Breastfeeding Duration and Early Parenting Behaviour: The Importance of an Infant-Led, Responsive Style. Wiley AS, ed. *PLoS One.* 2014;9(2):e83893. doi:10.1371/journal.pone.0083893
137. Noble KG, Houston SM, Brito NH, et al. Family income, parental education and brain structure in children and adolescents. *Nat Neurosci.* 2015;18(5):773-778. doi:10.1038/nn.3983
138. Tella P, Piccolo L da R, Rangel ML, et al. Socioeconomic diversities and infant development at 6 to 9 months in a poverty area of São Paulo, Brazil. *Trends Psychiatry Psychother.* 2018;40(3):232-240. doi:10.1590/2237-6089-2017-0008
139. Lago S, Cantarero D, Rivera B, et al. Socioeconomic status, health inequalities and non-communicable diseases: a systematic review. *J Public Health (Bangkok).* 2018;26(1):1-14. doi:10.1007/s10389-017-0850-z
140. Chen E, Miller GE. Socioeconomic Status and Health: Mediating and Moderating Factors. *Annu Rev Clin Psychol.* 2013;9(1):723-749. doi:10.1146/annurev-clinpsy-050212-185634
141. Banks LM, Kuper H, Polack S. Poverty and disability in low- and middle-income countries: A systematic review. van Wouwe JP, ed. *PLoS One.* 2017;12(12):e0189996. doi:10.1371/journal.pone.0189996
142. Sheridan MA, McLaughlin KA. Neurobiological models of the impact of adversity on education. *Curr Opin Behav Sci.* 2016;10:108-113. doi:10.1016/j.cobeha.2016.05.013
143. Winding TN, Andersen JH. Socioeconomic differences in school dropout among young adults: the role of social relations. *BMC Public Health.* 2015;15(1):1054. doi:10.1186/s12889-015-2391-0
144. Dinour LM, Bai YK. Breastfeeding: The Illusion of Choice. *Women's Heal Issues.* 2016;26(5):479-482. doi:10.1016/j.whi.2016.06.002
145. Buccini G dos S, Benício MHD, Venancio SI. Determinants of using pacifier and bottle feeding. *Rev Saude Publica.* 2014;48(4):571-582. doi:10.1590/S0034-8910.2014048005128
146. Venancio SI, Monteiro CA. Individual and contextual determinants of exclusive breast-feeding in São Paulo, Brazil: a multilevel analysis. *Public Health Nutr.* 2006;9(1):40-46. doi:10.1079/PHN2005760

147. Vianna RP de T, Rea MF, Venancio SI, Escuder MM. A prática de amamentar entre mulheres que exercem trabalho remunerado na Paraíba, Brasil: um estudo transversal. *Cad Saude Publica*. 2007;23(10):2403-2409. doi:10.1590/S0102-311X2007001000015
148. Hackshaw A. Small studies: strengths and limitations. *Eur Respir J*. 2008;32(5):1141-1143. doi:10.1183/09031936.00136408
149. Jain A, Concato J, Leventhal JM. How Good Is the Evidence Linking Breastfeeding and Intelligence? *Pediatrics*. 2002;109(6):1044-1053. doi:10.1542/peds.109.6.1044
150. Burnham L, Buczek M, Braun N, Feldman-Winter L, Chen N, Merewood A. Determining Length of Breastfeeding Exclusivity. *J Hum Lact*. 2014;30(2):190-194. doi:10.1177/0890334414525682
151. Bhaskaran K, Smeeth L. What is the difference between missing completely at random and missing at random? *Int J Epidemiol*. 2014;43(4):1336-1339. doi:10.1093/ije/dyu080
152. Rubin DB. *Multiple Imputation for Nonresponse in Surveys*. Vol 81. John Wiley & Sons; 2004.
153. Bodner TE. What Improves with Increased Missing Data Imputations? *Struct Equ Model A Multidiscip J*. 2008;15(4):651-675. doi:10.1080/10705510802339072
154. Kang H. The prevention and handling of the missing data. *Korean J Anesthesiol*. 2013;64(5):402. doi:10.4097/kjae.2013.64.5.402

11. ATIVIDADES NO EXTERIOR

Conforme mencionado na sessão MÉTODOS, foi acordado que os dados da subamostra Coorte ROC seriam utilizados no desenvolvimento da tese e análises dos dados para a obtenção do título de Doutora em Ciências pela FMUSP. Paralelamente às atividades relacionadas a presente tese, também foram realizadas atividades do exterior com intuito de complementar as atividades realizadas no Brasil, assim como a obtenção e aplicação de novas técnicas de análise de dados. As atividades no exterior foram financiadas pelo Programa Institucional de Internacionalização (PrInt) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no edital nº 01/2019 – PrInt USP para o programa de Doutorado Sanduíche no Exterior 2019.

Durante o período de 6 meses – setembro de 2019 a fevereiro de 2020 – a aluna realizou atividades de ensino e pesquisa no *Swiss Tropical and Public Health Institute* (Swiss TPH) supervisionadas pelo Günther Fink, PhD. Durante o período a aluna participou de reuniões e seminários, disciplinas oferecidas pela *University of Basel* e também um curso de Sistema de Informação Geográfica (GIS, sigla em inglês), além de apresentar ao final o resultado da pesquisa realizada durante o período.

Todas as atividades realizadas contribuíram para a realização do estudo intitulado: “*Associations between neighborhood violence during pregnancy and birth outcomes: Evidence from São Paulo’s Western Region Birth Cohort*”, que está, atualmente sob revisão na *BMC Public Health* e poder ser acessado na íntegra pelo link <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-40469/v1> ou na

sessão PUBLICAÇÕES deste documento. A aluna também contribuiu como co-autora no artigo: “*Breastfeeding, Physical Growth, and Cognitive Development: Evidence From a Middle Income Country*” (em revisão na revista *Pediatrics*) que tem como primeira autora a pesquisadora Jordyn T. Wallenborn, PhD.

12. PUBLICAÇÕES

Clinical Epigenetics

Breastfeeding, epigenetic gestational age at birth and its impact on neuropsychomotor development at 36 months of age: a moderation analysis

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:			
Full Title:	Breastfeeding, epigenetic gestational age at birth and its impact on neuropsychomotor development at 36 months of age: a moderation analysis		
Article Type:	Research		
Section/Category:	Aging and Development Epigenetics		
Funding Information:	<table border="1"><tr><td>Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (001)</td><td>Miss Angélica Carreira dos Santos</td></tr></table>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (001)	Miss Angélica Carreira dos Santos
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (001)	Miss Angélica Carreira dos Santos		
Abstract:	<p>Background: Recently, a study showed that gestational age (GA) could be accurately estimated at birth from the DNA methylation (DNAm) of fetal umbilical cord blood. Studies suggest that the adversities suffered during sensitive periods can modulate the individual's epigenome, with short and long-term health consequences. These associations might be due to the possible relationship between epigenetic GA, and the adverse exposures suffered in utero. Although the evidence on epigenetic mechanisms concerning the association between breastfeeding and child development is not conclusive, studies have shown the positive effects of breastfeeding on a child's health.</p> <p>Methods: 96 pregnant women were recruited as a subsample of the Western Region Cohort (ROC). Umbilical cord blood was collected at the time of delivery according to standardized protocols. According to the manufacturer's protocol, the cord blood DNA methylation analyzes were performed using the Illumina HumanMethylation450 (450k) BeadChips platform. Epigenetic GA was calculated based on DNA methylation of 143 CpGs sites using the Knight method. Data on child development at three years of age were collected during home visits by trained interviewers. We used linear regression models to evaluate the associations. Multiple imputations were applied to deal with the missing data.</p> <p>Results: At birth, GA acceleration was associated with thoracic circumference (-0.30; 95% CI: -0.57; -0.03) and length-for-age (0.42; 95% CI: 0.03; 0.81). Birth weight had a modest inverse association with GA acceleration (-0.001; 95% CI: -0,000; -0,000). According to the chronological GA classification, preterm children had an acceleration of GA 2.6 weeks higher than full-term children (95% CI: 0.60-4.54). No associations were found between epigenetic GA and child development at 3 years of age when breastfeeding was used as a moderating factor.</p> <p>Conclusions: This study provides evidence that the acceleration of GA is associated with the newborn's premature births and anthropometric characteristics. The association with child development or obesity at 3 years is not statistically significant. Larger studies are needed to understand the factors behind the epigenetic clock and its association with outcomes at birth, neurocognitive, and physical development of children in the Brazilian population.</p>		
Corresponding Author:	Angélica Carreira dos Santos Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina: Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina Sao Paulo, SP BRAZIL		
Corresponding Author E-Mail:	angelica.carreira@usp.br;angelica.carreira@gmail.com		
Corresponding Author Secondary Information:			
Corresponding Author's Institution:	Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina: Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina		
Corresponding Author's Secondary Institution:			
First Author:	Angélica Carreira dos Santos		

First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Angélica Carreira dos Santos
	Alexandra Brentani, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
<p>Is this study a clinical trial?</p> <p>A clinical trial is defined by the World Health Organisation as 'any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes'.</p>	No

[Click here to view linked References](#)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Title: Breastfeeding, epigenetic gestational age at birth and its impact on neuropsychomotor development at 36 months of age: a moderation analysis

Authors: Angélica Carreira dos Santos^{1*}, Alexandra Brentani¹

Author Affiliations:

¹ Department of Pediatrics, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

Corresponding author:

* Angélica Carreira dos Santos, Department of Pediatrics, University of São Paulo, Medical School, Av.

Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 647, São Paulo, CEP-01246-904, Brazil

e-mail: angelica.carreira@usp.br

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ABSTRACT

Background: Recently, a study showed that gestational age (GA) could be accurately estimated at birth from the DNA methylation (DNAm) of fetal umbilical cord blood. Studies suggest that the adversities suffered during sensitive periods can modulate the individual’s epigenome, with short and long-term health consequences. These associations might be due to the possible relationship between epigenetic GA, and the adverse exposures suffered in utero. Although the evidence on epigenetic mechanisms concerning the association between breastfeeding and child development is not conclusive, studies have shown the positive effects of breastfeeding on a child’s health.

Methods: 96 pregnant women were recruited as a subsample of the Western Region Cohort (ROC). Umbilical cord blood was collected at the time of delivery according to standardized protocols. According to the manufacturer’s protocol, the cord blood DNA methylation analyzes were performed using the Illumina HumanMethylation450 (450k) BeadChips platform. Epigenetic GA was calculated based on DNA methylation of 143 CpGs sites using the Knight method. Data on child development at three years of age were collected during home visits by trained interviewers. We used linear regression models to evaluate the associations. Multiple imputations were applied to deal with the missing data.

Results: At birth, GA acceleration was associated with thoracic circumference (-0.30; 95% CI: -0.57; -0.03) and length-for-age (0.42; 95% CI: 0.03; 0.81). Birth weight had a modest inverse association with GA acceleration (-0.001; 95% CI: -0,000; -0,000). According to the chronological GA classification, preterm children had an acceleration of GA 2.6 weeks higher than full-term children (95% CI: 0.60-4.54). No associations were found between epigenetic GA and child development at 3 years of age when breastfeeding was used as a moderating factor.

Conclusions: This study provides evidence that the acceleration of GA is associated with the newborn’s premature births and anthropometric characteristics. The association with child development or obesity at 3 years is not statistically significant. Larger studies are needed to understand the factors behind the epigenetic clock and its association with outcomes at birth, neurocognitive, and physical development of children in the Brazilian population.

Keywords: Aging, Gestational age, Cord blood methylation, Epigenetic clock; Child development, Breastfeeding.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Introduction

Although Early Childhood Development (ECD) has improved in Low- and Middle-Income Countries (LMICs) in the past decades, it is estimated that more than 250 million children under five years old are still at risk of not reaching their full development potential [1]. Promoting adequate childhood development is extremely important for a healthy life and an equal society [2]. Epigenetics mechanisms are fundamental in the regulation of cellular and physiological development. Among the many epigenetic mechanisms, DNA methylation (DNAm) is the most studied and well-characterized.

DNAm is characterized by adding a methyl group primarily to cytosine linked to guanine by phosphate (CpG) sites. Recently, Horvath [3] developed a model to estimate biological age (epigenetic age) using the DNAm of 353 CpG of multiple tissues. The difference between chronological and epigenetic age is defined as epigenetic age acceleration (AA), and it has been shown that this marker is associated with all-cause mortality [4–6], menopause [7], lower physical and cognitive function [8], Alzheimer [9], and obesity [10,11].

The Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) framework suggests that during the intrauterine period, the exposition to adversities may lead to short and long-term consequences such as low birth weight (LBW) [12–16] and non-communicable diseases [15,17,18]. Similarly to the Horvath model [3], Knight et al. [19] developed a DNAm gestational age (GA) predictor, using fetal umbilical cord blood or newborn blood sample. This DNAm based predictor uses 143 CpGs sites uniformly distributed throughout the genome and is highly correlated to the chronological GA assessed by ultrasound [19].

Although in adults, AA has been used to predict adverse health outcomes accurately, the role of DNAm GA on child development is less clear. Studies have shown the association between GA acceleration (GAA) and adverse exposures during pregnancy, such as low socioeconomic status (SES),

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

maternal age, pre-eclampsia, gestational diabetes, and adverse birth outcomes such as LBW, lower Apgar 1-min, prematurity, and sex [19–21]. GAA has also been associated with poor child development and internalizing problems during adolescence [21,22].

During the first few years, the brain develops faster than any other given period in life. The interactions between genes and the environment to which the child is exposed to shape the development of the brain circuits [23–25]. Breastfeeding is considered an essential factor in promoting healthy physical and cognitive development [26–29]. Evidence suggests that breastfeeding is positively associated with neurocognitive development and intelligence [28,30], and it can also influence DNAm [31]. Furthermore, breastfeeding plays an essential role in maternal responsiveness and bonding to the child, which might be a mechanism through which breastfeeding benefits child development [23,32].

In this study, we aim to use the Knight et al. [19] model to predict DNAm GA at birth and explore it as a proxy of adverse exposures during the antenatal period and its association with GAA. Further, we aimed to investigate the association between GAA and ECD at 3 years and test whether these associations were moderated by breastfeeding.

Methods

Study population

We used data from the Western Region Birth Cohort (*Região Oeste Coorte – ROC-Cohort*), which is a longitudinal birth cohort study situated in the Western Region of São Paulo, Brazil [33]. We recruited 6,207 mothers that gave birth at the University Hospital of the School of Medicine of the University of São Paulo (HU-USP). The cohort profile published elsewhere [33] contains details of the study design, inclusion criteria, and collected data. As part of the ROC-Cohort [33], a sub-sample of 96 mother-neonate dyads were randomly selected for additional biological data collection, including cord

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

blood, placenta, and blood samples from mothers and babies. We use these 96 dyads' subsample in the present study (**Supplementary file 1: Flowchart**).

Birth data such as type of delivery, gestational length, weight at birth, and others were collected from the HU Hospital's patient registry information system. During the postpartum hospitalization period, trained interviewers collected information on pregnancy, maternal health, income, and goods possession.

Umbilical cord blood DNA methylation and DNAm GA at birth

Umbilical cord blood was collected according to standard procedures. The DNA was isolated from umbilical cord blood and bisulfite-converted using the EZ DNA Methylation kit (Zymo Research Corp). The Human Methylation 450 BeadChip microarrays (HM450K, Illumina) were used to measure the DNAm levels of 485,577 CpG sites. The DNAm levels were provided in beta-values (β values) that ranged from 0 (unmethylated) to 1 (fully methylated). All quality control steps and detailed procedures can be found elsewhere [34].

The DNAm GA was based on the methylation profile of 148 CpG sites, as described by Knight et al. [19]. Gestational length in weeks was estimated using the New Ballard Score [35]. The raw difference between DNAm GA and GA was calculated to obtain the raw GAA. Additionally, GAA was also obtained as the residual from the regression of DNAm GA on GA. This method was used to remove the effect of chronological GA entirely.

Child development outcome

The outcomes were assessed during home visits in the 3-years follow-up. Trained interviewers administered the questionnaires and assessed the children after written parental consent. The questionnaire consisted of information on sociodemographic data, parental stress, food insecurity, caregiver social support, child development, and behavior indicators, and home environment quality.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The Regional Project on Child Development Indicators (PRIDI [Engle scale]), developed for Latin American countries, was used to assess ECD. PRIDI is a 21 items direct observation tool for children between 24–59 months [36]. The items are distributed in four domains (cognition, language and communication, motor development, and socioemotional development), and each item is scored separately. The sum of all items varies from 0 to 61 points—higher scores corresponding to a better ECD. The total score was normalized for the analysis.

Breastfeeding

During the 3-year home visit, the mother or caregiver reported the duration of exclusive (EBF) and total breastfeeding (TBF). Data on breastfeeding was obtained in months through two questions “For how many months did the child exclusively receive breast milk?” and “For how many months in total did the child receive any breast milk?”.

Confounders

Studies have shown that the SES level is associated with GAA [19] and child development [37,38]. Using Principal Component Analysis (PCA) [39], we built an SES indicator using total family income, house residents, household number of rooms, bedrooms, bathrooms, and goods possession. Afterward, the first component was extracted and categorized into terciles to represent the families’ SES (low, medium, and high).

The relevant necessary resources for proper child development change according to age. However, the home environment and parental involvement are important predictors of child development regardless of the child’s age [40–44]. We used the HOME inventory (Home Observation for Measurement of the Environment) data collected at the 3 years home visit. The HOME consists of 45 observational and reported items to assess the quality of the home environment, and is based on caregiver’s emotional and verbal responsiveness, punishment and restriction, physical and temporal

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

environment organization, availability of appropriate materials, toys and games, the involvement of the caregiver with the child, and opportunity for variation in daily stimulation [45]. The final score is obtained by adding the items, where higher scores indicate a better home and family environment for the child.

Statistical Analyses

We assessed the associations of maternal characteristics such as age, weight gain, BMI, educational level, skin color, and SES with their offspring GAA using linear regressions. Birth outcomes as weight, height, and head, thoracic and abdominal circumferences, Apgar, and Small-for-gestational-age (SGA) were used as dependent variables of GAA. For that, we applied linear regression models using GAA as exposure while adjusting for SES and child sex.

Further, we tested the child's development with PRIDI standardized scores as outcomes of GAA using linear regression models while adjusting for the child's sex, family SES, maternal age, and HOME score. We also tested whether the associations varied by type (exclusive and total) and breastfeeding duration, adding an interaction term ($GAA \times \text{breastfeeding}$) in the regression equation. Due to missingness in the observed dataset, we used multiple imputations by chained equations (MICE) to complete the missing data (see **Supplementary file 2**). Statistical analyses were performed using Stata 14 [46].

Results

Among the 96 mothers randomly selected, two had twin pregnancies and were excluded. Another 5 were excluded due to lack of GA information, rendering 89 mother-neonate dyads in the studied sample. Of these, 70 (78.7%) agreed to participate in the 3-years follow-up and were included in this study. The characteristics of the 70 participants included in our analysis are shown in **Table 1**.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Supplementary file 3: **Table S2** shows the differences between the final sample and those excluded or did not participate in the 3 years follow-up.

The mean GA at birth was 39.4 (standard deviation [SD] 1.53) weeks, and DNAm GA was 38.7 (SD 1.55) weeks. Pearson correlation coefficient between DNAm GA and GA was weak for the entire sample ($r = 0.17$; $p = 0.16$). When stratified by sex, the correlation was moderate for males ($r = 0.51$; $p = 0.004$), and weak for females ($r = -0.16$; $p = 0.32$). The average difference between DNAm GA and ultrasound assessed GA (raw GAA) was -0.69 (SD 1.98) weeks, and the residual GAA was 0.00 (SD 1.39) weeks for the entire sample, -0,06 (SD 1.64) weeks for females, and 0.07 (SD 1.39) weeks for males.

[Table 1 here]

Maternal characteristics and DNAm GA at birth

Table 2 shows the associations between maternal characteristics and offspring DNAm GA, raw GAA, and residual GAA at birth. All models were adjusted for child sex. None of the observed maternal characteristics were associated with DNAm GA, raw GAA, and residual GAA at birth.

[Table 2 here]

Newborns' characteristics and DNAm GA at birth

1
2
379 At birth, raw GAA was negatively associated with thoracic circumference (β : -0.31; 95%
4
5 confidence interval [CI]: -0.58; -0.03) and with an increase of 0.42 SD in the length-for-age z-score
6
7 (95% CI: 0.02; 0.83), as shown in **Table 3**. The birth weight had a slight negative association with raw
81
9 GAA, where each week of GAA represented a reduction of 0.001 grams of the newborn's weight (95%
10
11 CI: -0.00; -0.00). According to the chronological GA classification, preterm children had a raw GAA of
12
13 the GA 2.57 weeks higher than full-term children (95% CI: 0.59; 4.56). **Figure 1** shows the
14
15 associations between raw GAA and birth weight, length-for-age z-score and thoracic circumference,
16
17 and the box-plot with the distribution of raw GAA according to the classification of the GA. Residual
18
19 GAA was not associated with birth characteristics.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

188
189 **[Table 3 here]**
30
31
32
33

191 *DNAm GA at birth, breastfeeding, and child's development at 3-years*

34
35
36

192 At 3-year, children were 43.7 months in average (SD: 4.06), with a weight-for-age z-score of -
37
38 0.32 (SD: 1.33), height-for-age 1.06 (SD: 1.77) and weight-for-height 0.45 (SD: 1.21). The average
39
40 exclusive breastfed duration was (EBF) 4.68 (SD: 1.45) months, and the average total breastfed
41
42 duration (TBF) was 10.32 (SD: 7.98) months. The mean PRIDI score was 35.87 (SD: 15.98), and after
43
44 standardization, 0.00 (SD \pm 1.00).
45
46
47
48
49

197 **Tables 4 and 5** show no significant association between PRIDI scores at 3-years and DNAm
50
51 GA, raw GAA, nor residual GAA. EBF was associated with an increase of 0.22 SD in the PRIDI score
52
53 for each additional month of EBF (95%CI: 0.01; 0.44) in Model 1; however, these associations were
54
55 lost when adjusted for other covariates in Model 2. The interactions between these exposures and
56
57 breastfeeding (EBF and TBF) were not significant.
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Although we could not find associations between DNAm GA and child’s development at 36 months, the most consistent factor associated with child development improvement was the HOME stimulation score. In all models, HOME was associated with an increase of 0.04 SD of PRIDI score per unit of change in the HOME stimulation score. Moreover, being at high SES increased the PRIDI score around 0.70 SD when observing the TBF interaction models.

[Table 4 here]

[Table 5 here]

Discussion

Our analyses suggest that prematurity, higher length-for-age z-score, lower birth weight, and thoracic circumference were associated with higher raw GAA at birth. There was no clear evidence of GAA associations with maternal age, education, SES or skin color. Moreover, nor DNAm GA or GAA was associated with child development at 3-years, nor moderated by breastfeeding (EBF and TBF).

We showed that characteristics known to reflect the exposure to adversities in the intrauterine period were associated with raw GAA at birth. The DOHaD hypothesis suggests that during sensitive and highly plastic periods, such as the intrauterine period, the adversities suffered can modulate the individual’s epigenome, generating immediate consequences such as LBW [12–16] and also long-term health consequences [15,17,18]. However, it is not clear whether the GAA at birth is a positive or negative factor for newborns’ health and how it impacts the health of the individual over time.

1
2
224
4
225
6
7
226
9
10
227
11
12
228
13
14
1229
16
17
230
18
19
20
231
22
2232
24
25
233
26
27
2234
29
30
235
31
32
236
34
35
237
36
37
238
39
40
239
41
42
240
43
44
45
241
47
48
242
49
50
243
51
52
244
54
55
245
56
57
246
59
60
247
61
62
63
64
65

Birth weight is widely used as a proxy for fetal development in studies investigating the intrauterine environment and its association with short and long-term outcomes [12,47,48]. In our study, birth weight and thoracic circumference were negatively associated with raw GAA. These results corroborate the study by Girchenko et al. [49], who found a negative association between raw GAA and birth weight, length, and head circumference. In contrast, although our results point to a negative association, we do not replicate the associations they found between GAA and 40 years or older mothers, Apgar 1-min, and female sex.

In the opposite direction, Khouja et al. [50] found positive associations between GAA, weight, length at birth, sex, and pre-gestational BMI, and Bright et al. [51] found positive associations between weight and length at birth. The discrepancies between these results may be due to the different methodologies used to calculate DNAm GA and GAA. Girchenko et al. [49], like our study, applied the method proposed by Knight et al. [19], using data from 15 cohorts of different ancestry, including pre- and post-term births, to select 148 CpG sites to estimate the DNAm GA. In comparison, Khouja et al. [50] and Bright et al. [51] used the method proposed by Bohlin et al. [52], developed based on data from the MoBa cohort, which did not include preterm births and used 96 CpG sites to estimate the DNAm GA. Another relevant point is that our findings and the one's from Girchenko et al. [49] were based on the raw GAA while Khouja et al. [50] and Bright et al. [51], were based on the residual GAA.

Our findings also show that raw GAA was significantly higher in premature children than full-term children, which has been associated with a reduction in respiratory morbidities in childhood [53]. A study that evaluated the neurobehavioral profile in preterm children (<30 weeks) found that those with ideal neurobehavioral profiles had a DNAm GA compared to those with atypical profiles [54]. Those with atypical profiles also had several CpGs sites differentially methylated in multiple genes linked to neurobehavioral or neurodegenerative structure, function, or conditions [54]. We can not yet say which is the role of DNAm GA in intrauterine development or during childhood. However, the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

GAA in this group seems to indicate a “catch-up” and be favorable for neonatal outcomes and child development.

There was no evidence that DNAm GA was associated with child development in the 3-years follow-up in our sample. Suarez et al. [21], on the other hand, it found that lower DNAm GA was associated with child development disadvantage in boys, at 3 years of age, with more total and internalizing problems. These findings are somewhat surprising since the opposite is observed in the adult population, where adverse outcomes are more associated with a higher epigenetic age than chronological age. In another study by the same group, Suarez et al. [22] found that in adolescence, the situation was reversed, the AA was positively associated with internalizing problems, but they did not find associations with cognitive function and intelligence. Although these results point in opposite directions, the DNA methylation profile changes over time [55], and the highest rates of change are found between 2 and 10 years of age [56], so we can not rule out that the AA has a different role during childhood.

Studies investigating the associations between GAA or AA and physical and neurocognitive development during childhood have little or hardly evaluated breastfeeding. To our knowledge, only Simpkin et al. [57] investigated whether breastfeeding (included in the analysis as a binary variable) was associated with AA in childhood and adolescence, founding no association between breastfeeding and AA at any of the evaluated ages. Our results also do not support the initial hypothesis that breastfeeding improves child development and moderates the effect of DNAm GA on outcomes at 3 years of age. However, Wallenborn et al. [58] showed that the whole group of children from the ROC-Cohort who was EBF for 6 months and received breastmilk until the age of 2 had a 0.4 SD increase in PRIDI score (β : 0.38; confidence limits [CL]: 0.23; 0.53) at 3-years [59,60].

This study has some limitations. The small sample size may be the most important, especially considering that child development differences due to the studied expositions may not be very large.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Moreover, there is plenty of evidence supporting the importance of breastfeeding on child development [27,28,30]. We might hypothesize that breastfeeding is not in the causal pathway of the associations between DNAm GA and child development.

Studies that assess the epigenetic profile and breastfeeding effects require caution since a randomized allocation of breastfeeding are not ethically feasible. Therefore, it is necessary to disentangle the impact of environmental expositions and breastfeeding (which may be subtle) on the child's development. Adjusting the analyses for these additional predictors (like HOME score and SES), especially when the coefficients are very close to 0, could reduce DNAm GA and breastfeeding effects, which perhaps cease to be statistically significant in the model, becoming not explanatory variables, but possible markers.

It is also important to highlight that breastfeeding data were obtained through the 3-year follow-up questionnaire and that data, especially EBF, may be subject to memory bias. The TBF tends to be more accurately remembered than EBF since it depends on introducing foods and liquids [61,62]. However, the data tends to be reliable, especially in studies with continuous follow-up, as the ROC-Cohort. In the study by Burnham et al. [63], data on EBF was collected prospectively in the first 6 months of the child's life and then at 2 years after birth. They showed that 30% of mothers reported at the two-year follow-up similar to what was reported prospectively, the 2 years report tended to overestimate EBF time. In areas where EBF is widely promoted, this bias might be even more significant due to the desire for social acceptance [62]. Mothers in our study were followed-up from birth and interviewed during a similar postpartum period and live in the same city region, so they were possibly similarly exposed to breastfeeding promoting actions. Hence, despite the memory bias, we believe that the bias is similar for all mothers, causing no systematic difference in our results.

Another factor that can be considered limiting in this study is the missing rate in our breastfeeding variables. According to the analyzes described in Additional file 1, our sample's

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

missingness pattern was “missing at random”, which means no systematic difference between the missing and the observed values [64]. Considering this characteristic, we opted to use MICE to restore the data’s natural variability and incorporate the missing data’s uncertainty, resulting in more valid statistical inferences [65,66]. Besides, multiple imputations are robust to the violation of the assumption of data normality and produce satisfactory results even in small samples and with a high proportion of missing values [65,66].

303 **Conclusions**

304 Our findings show that several birth characteristics widely known to reflect the intrauterine
305 environment, such as preterm birth and lower birth weight, were associated with higher raw GAA at
306 birth, but not with child development at 3 years. It also seems that breastfeeding does not moderate
307 these results. More studies with larger samples are needed to understand DNAm GA’s role at birth and
308 its impacts on child development and if breastfeeding plays a role in the epigenetic modifications
309 during childhood.

311 **List of abbreviations**

312 95%CI: 95% confidence interval

313 AA: Age acceleration

314 CL: confidence limits

315 CpG: Cytosine linked to Guanine by phosphate

316 DNAm: DNA methylation

1
2
3
317 DOHaD: Developmental Origins of Health and Disease
4
5
6
318 EBF: Exclusive breastfeeding
7
8
9
319 ECD: Early Childhood Development
10
11
12
320 GA: Gestational age
13
14
15
321 GAA: Gestational age acceleration
16
17
18
322 HOME: Home Observation for Measurement of the Environment
19
20
21
323 HU-USP: University Hospital of the School of Medicine of the University of São Paulo
22
23
24
324 LBW: Low birth weight
25
26
27
325 LMICs: Low-middle-income countries
28
29
30
31
326 MICE: Multiple imputations by chained equations
32
33
34
327 PCA: Principal component analysis
35
36
37
328 PRIDI: Regional Project on Child Development Indicators
38
39
40
329 ROC-Cohort: Western Region Birth Cohort (*Região Oeste Coorte*)
41
42
43
44
330 SD: Standard deviation
45
46
47
48
331 SES: Socioeconomic status
49
50
51
332 SGA: Small-for-gestational-age
52
53
54
333 TBF: Total breastfeeding
55
56
57
58
59
335 **Declarations**
60
61
62
63
64
65

1
2
336
4
5
337
7
338
9
10
1339
12
13
14
15
1341
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Ethics approval and consent to participate

The Ethics Committee for the Analysis of Research Projects (*Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa*, CAPPesq) of the University Hospital of the School of Medicine of the University of São Paulo (HCFMUSP) approved this study under protocol number: 79776417.0.0000.0065. All mothers who agreed to participate in the ROC-Cohort signed the consent form after being informed about the study and after all questions were answered by trained interviewers.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The individual data that support the findings of this study include personal information and health-related data. Therefore, the data are not publicly available. Upon reasonable request to the corresponding author after obtaining permission from the University Hospital of the School of Medicine of the University of São Paulo's Ethics board following the ethics policy statements related to the study protocol, the data may be made available.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Funding

This study was financed in part by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)* - Finance Code 001. The funding agency had no role in the analysis, collection, and interpretation of data, nor did it in the writing process.

Author's contributions

ACS and AB contributed to the conception and design of the study. ACS designed the tables and figures, performed the statistical analysis and drafted the manuscript. AB, as the principal investigator of the ROC-Cohort, coordinated and supervised data collection, contributed to the analysis and interpretation of the results, and critically reviewed the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

Not applicable.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

References

1. Black MM, Walker SP, Fernald LCH, Andersen CT, DiGirolamo AM, Lu C, et al. Early childhood development coming of age: science through the life course. *Lancet*. 2017;389:77–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616313897>
2. Shonkoff JP, Richter L, van der Gaag J, Bhutta ZA. An Integrated Scientific Framework for Child Survival and Early Childhood Development. *Pediatrics*. 2012;129:e460–72. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2011-0366>
3. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*. 2013;14:R115. Available from: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
4. Marioni RE, Shah S, McRae AF, Chen BH, Colicino E, Harris SE, et al. DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biol*. 2015;16:25. Available from: <http://genomebiology.com/2015/16/1/25>
5. Christiansen L, Lenart A, Tan Q, Vaupel JW, Aviv A, McGue M, et al. DNA methylation age is associated with mortality in a longitudinal Danish twin study. *Aging Cell*. 2016;15:149–54. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/accel.12421>
6. Horvath S, Pirazzini C, Bacalini MG, Gentilini D, Di Blasio AM, Delledonne M, et al. Decreased epigenetic age of PBMCs from Italian semi-supercentenarians and their offspring. *Aging (Albany NY)*. 2015;7:1159–70. Available from: <http://www.aging-us.com/article/100861>
7. Levine ME, Lu AT, Chen BH, Hernandez DG, Singleton AB, Ferrucci L, et al. Menopause accelerates biological aging. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;113:9327–32. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1604558113>
8. Marioni RE, Shah S, McRae AF, Ritchie SJ, Muniz-Terrera G, Harris SE, et al. The epigenetic clock is correlated with physical and cognitive fitness in the Lothian Birth Cohort 1936. *Int J Epidemiol*. 2015;44:1388–96. Available from: <https://academic.oup.com/ije/article-lookup/doi/10.1093/ije/dyu277>
9. Levine ME, Lu AT, Bennett DA, Horvath S. Epigenetic age of the pre-frontal cortex is associated with neuritic plaques, amyloid load, and Alzheimer’s disease related cognitive functioning. *Aging (Albany NY)*. 2015;7:1198–211. Available from: <http://www.aging-us.com/article/100864>

- 1
2
3 10. Horvath S, Erhart W, Brosch M, Ammerpohl O, von Schonfels W, Ahrens M, et al. Obesity
4 accelerates epigenetic aging of human liver. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111:15538–43. Available from:
5
6 402 <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1412759111>
7
8
9 403 11. Nevalainen T, Kananen L, Marttila S, Jylhävä J, Mononen N, Kähönen M, et al. Obesity accelerates
10 epigenetic aging in middle-aged but not in elderly individuals. *Clin Epigenetics*. *Clinical Epigenetics*;
11 404 2017;9:20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13148-016-0301-7>
12
13 405
14
15 406 12. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ*. 1995;311:171–4. Available from:
16
17 407 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7613432>
18
19
20 408 13. Barker DJP. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med*. 2007;261:412–7.
21 Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x>
22
23
24 410 14. Wadhwa P, Buss C, Entringer S, Swanson J. Developmental Origins of Health and Disease: Brief
25 History of the Approach and Current Focus on Epigenetic Mechanisms. *Semin Reprod Med*.
26 411 2009;27:358–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2862635>
27
28 412
29
30 413 15. Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends*
31 *Endocrinol Metab*. 2004;15:183–7. Available from:
32
33 414
34 415 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043276004000578>
35
36
37 416 16. Hanson M, Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD. Developmental plasticity and
38 developmental origins of non-communicable disease: Theoretical considerations and epigenetic
39 mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol*. 2011;106:272–80. Available from:
40 418
41
42 419 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079610710001276>
43
44
45 420 17. Entringer S, Buss C, Swanson JM, Cooper DM, Wing DA, Waffarn F, et al. Fetal Programming of
46 Body Composition, Obesity, and Metabolic Function: The Role of Intrauterine Stress and Stress
47 Biology. *J Nutr Metab*. 2012;2012:1–16. Available from:
48 422
49
50 423 <http://www.hindawi.com/journals/jnme/2012/632548/>
51
52
53 424 18. Gluckman PD, Low FM, Buklijas T, Hanson MA, Beedle AS. How evolutionary principles
54 improve the understanding of human health and disease. *Evol Appl*. 2011;4:249–63. Available from:
55
56 425
57 426 <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1752-4571.2010.00164.x>
58
59
60 427 19. Knight AK, Craig JM, Theda C, Bækvad-Hansen M, Bybjerg-Grauholm J, Hansen CS, et al. An
61 epigenetic clock for gestational age at birth based on blood methylation data. *Genome Biol*. *Genome*
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 429 Biology; 2016;17:206. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-016-1068-z>
- 430 20. Girchenko P, Lahti J, Czamara D, Knight AK, Jones MJ, Suarez A, et al. Associations between
431 maternal risk factors of adverse pregnancy and birth outcomes and the offspring epigenetic clock of
432 gestational age at birth. *Clin Epigenetics*. 2017;9:49. Available from:
433 <http://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-017-0349-z>
- 434 21. Suarez A, Lahti J, Czamara D, Lahti-Pulkkinen M, Knight AK, Girchenko P, et al. The Epigenetic
435 Clock at Birth: Associations With Maternal Antenatal Depression and Child Psychiatric Problems. *J*
436 *Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2018;57:321-328.e2. Available from:
437 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890856718301072>
- 438 22. Suarez A, Lahti J, Czamara D, Lahti-Pulkkinen M, Girchenko P, Andersson S, et al. The epigenetic
439 clock and pubertal, neuroendocrine, psychiatric, and cognitive outcomes in adolescents. *Clin*
440 *Epigenetics*. 2018;10:96. Available from:
441 <https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-018-0528-6>
- 442 23. World Health Organization, United Nations Children’s Fund, World Bank Group. Nurturing care
443 for early childhood development: a framework for helping children survive and thrive to transform
444 health and human potential. Geneva: World Health Organization; 20.
- 445 24. Shonkoff JP, Garner AS, Siegel BS, Dobbins MI, Earls MF, Garner AS, et al. The Lifelong Effects
446 of Early Childhood Adversity and Toxic Stress. *Pediatrics*. 2012;129:e232–46. Available from:
447 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22201156>
- 448 25. van IJzendoorn MH, Bakermans-Kranenburg MJ, Ebstein RP. Methylation Matters in Child
449 Development: Toward Developmental Behavioral Epigenetics. *Child Dev Perspect*. 2011;5:305–10.
450 Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-8606.2011.00202.x>
- 451 26. Walker SP, Wachs TD, Grantham-McGregor S, Black MM, Nelson CA, Huffman SL, et al.
452 Inequality in early childhood: risk and protective factors for early child development. *Lancet*.
453 2011;378:1325–38. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673611605552>
- 454 27. Horta BL, Victora CG, Organization WH. Short-term effects of breastfeeding: a systematic review
455 on the benefits of breastfeeding on diarrhoea and pneumonia mortality. World Health Organization;
456 2013;
- 457 28. Horta BL, Victora CG. Long-term effects of breastfeeding. *World Heal Organ*. 2013;

- 1
2
458 29. World Health Organization (WHO). Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases: report
4
459 of a joint WHO/FAO expert consultation. World Health Organization; 2003.
6
460 30. Horta BL, Loret de Mola C, Victora CG. Breastfeeding and intelligence: a systematic review and
8
461 meta-analysis. *Acta Paediatr.* 2015;104:14–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/apa.13139>
10
11
462 31. Verduci E, Banderali G, Barberi S, Radaelli G, Lops A, Betti F, et al. Epigenetic effects of human
13
463 breast milk. *Nutrients.* 2014;6:1711–24.
14
15
464 32. Black MM, Aboud FE. Responsive feeding is embedded in a Theoretical Framework of responsive
17
465 parenting. *J Nutr.* 2011;141:490–4. Available from:
19
466 <https://academic.oup.com/jn/article/141/3/490/4743600>
21
22
467 33. Brentani A, Scoleze Ferrer AP, Brentani H, Liu CH, Grisi SJFE, Valente MH, et al. Cohort profile:
23
468 São Paulo Western Region Birth Cohort (ROC). *Int J Epidemiol.* 2020; Available from:
25
469 <https://academic.oup.com/ije/advance-article/doi/10.1093/ije/dyaa129/5922751>
27
28
470 34. Maschietto M, Bastos LC, Tahira AC, Bastos EP, Euclides VLV, Brentani A, et al. Sex differences
29
471 in DNA methylation of the cord blood are related to sex-bias psychiatric diseases. *Sci Rep. Nature*
31
472 *Publishing Group;* 2017;7:44547. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep44547>
33
34
473 35. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman BL, Lipp R. New Ballard Score,
35
474 expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr.* 1991;119:417–23. Available from:
37
475 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347605820566>
39
40
476 36. Verdisco A, Cueto S, Thompson J, Neuschmidt O. Urgency and possibility: First initiative of
42
477 comparative data on child development in Latin America. Rep. Inter-American Dev Bank, Washington,
43
478 DC Available [https://publications iadb org/bitstream/handle/11319/6849/PRIDI% 20Urgency% 20and% 20](https://publications.iadb.org/bitstream/handle/11319/6849/PRIDI%20Urgency%20and%20Possibility.pdf)
45
479 [Possibility. pdf.](https://publications.iadb.org/bitstream/handle/11319/6849/PRIDI%20Urgency%20and%20Possibility.pdf) 2015. doi10.1057/9781137305169.0009. Palgrave Macmillan; 2015.
47
48
480 37. Hackman DA, Farah MJ. Socioeconomic status and the developing brain. *Trends Cogn Sci.*
50
481 2009;13:65–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364661308002635>
51
52
482 38. Piccolo L da R, Arteche AX, Fonseca RP, Grassi-Oliveira R, Salles JF. Influence of family
54
483 socioeconomic status on IQ, language, memory and executive functions of Brazilian children. *Psicol*
56
484 *Reflexão e Crítica.* 2016;29:23. Available from: [http://prc.springeropen.com/articles/10.1186/s41155-](http://prc.springeropen.com/articles/10.1186/s41155-016-0016-x)
58
485 [016-0016-x](http://prc.springeropen.com/articles/10.1186/s41155-016-0016-x)
60
486 39. Vyas S, Kumaranayake L. Constructing socio-economic status indices: how to use principal
62
63
64
65

- 1
2
387 components analysis. *Health Policy Plan.* 2006;21:459–68. Available from:
4
388 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17030551>
6
- 739 40. KING AR. Family environment scale predictors of academic performance. *Psychol Rep.*
8
490 1998;83:1319. Available from: <http://asp.ammonsscscientific.com/find.php?resource=PR0.83.7.1319>
10
- 11
1491 41. Reynolds AJ. A structural model of first-grade outcomes for an urban, low socioeconomic status,
12
13492 minority population. *J Educ Psychol.* 1989;81:594–603. Available from:
14
15493 <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0022-0663.81.4.594>
16
- 17
1494 42. Stevenson DL, Baker DP. The Family-School Relation and the Child’s School Performance. *Child*
19
2495 *Dev.* 1987;58:1348. Available from: <https://www.jstor.org/stable/1130626?origin=crossref>
21
- 2496 43. Bradley RH, Caldwell BM, Rock SL, Ramey CT, et al. Home environment and cognitive
23
2497 development in the first 3 years of life: A collaborative study involving six sites and three ethnic
25
2498 groups in North America. *Dev Psychol.* 1989;25:217–35. Available from:
27
2499 <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0012-1649.25.2.217>
29
- 300 44. Ronfani L, Vecchi Brumatti L, Mariuz M, Tognin V, Bin M, Ferluga V, et al. The Complex
31
3501 Interaction between Home Environment, Socioeconomic Status, Maternal IQ and Early Child
33
3502 Neurocognitive Development: A Multivariate Analysis of Data Collected in a Newborn Cohort Study.
35
3503 Gorlova OY, editor. *PLoS One.* 2015;10:e0127052. Available from:
37
3504 <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0127052>
38
- 39
4505 45. Totsika V, Sylva K. The home observation for measurement of the environment revisited. *Child*
41
4506 *Adolesc Ment Health.* Wiley Online Library; 2004;9:25–35.
43
- 44
4507 46. StataCorp. 2015. *Stata Statistical Software: Release 14.* College Station, TX: StataCorp LP.
45
46
- 4508 47. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1344S-1352S.
48
4509 Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/71/5/1344S/4729552>
50
- 51
5110 48. World Health Organization. Global nutrition targets 2025: low birth weight policy brief. World
52
5511 Health Organization, 2014. World Health Organization; Available from:
54
5512 https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/149020/WHO_NMH_NHD_14.5_eng.pdf?ua=1
56
- 57
513 49. Girchenko P, Lahti J, Czamara D, Knight AK, Jones MJ, Suarez A, et al. Associations between
58
514 maternal risk factors of adverse pregnancy and birth outcomes and the offspring epigenetic clock of
60
515 gestational age at birth. *Clin Epigenetics.* *Clinical Epigenetics;* 2017;9:49. Available from:
62
63
64
65

1
2
316 <http://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-017-0349-z>
4
517 50. Khouja JN, Simpkin AJ, O’Keeffe LM, Wade KH, Houtepen LC, Relton CL, et al. Epigenetic
6 gestational age acceleration: a prospective cohort study investigating associations with familial,
718 gestational age acceleration: a prospective cohort study investigating associations with familial,
8 sociodemographic and birth characteristics. *Clin Epigenetics*. 2018;10:86. Available from:
919 <https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-018-0520-1>
10
1520
12
13
1421 51. Bright HD, Howe LD, Khouja JN, Simpkin AJ, Suderman M, O’Keeffe LM. Epigenetic gestational
1522 age and trajectories of weight and height during childhood: a prospective cohort study. *Clin*
16
1723 *Epigenetics*. 2019;11:194. Available from:
18
1924 <https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-019-0761-7>
20
21
2225 52. Bohlin J, Håberg SE, Magnus P, Reese SE, Gjessing HK, Magnus MC, et al. Prediction of
2326 gestational age based on genome-wide differentially methylated regions. *Genome Biol*. 2016;17.
24
25
2627 53. Knight AK, Smith AK, Conneely KN, Dalach P, Loke YJ, Cheong JL, et al. Relationship between
27
2828 Epigenetic Maturity and Respiratory Morbidity in Preterm Infants. *J Pediatr*. 2018;198:168-173.e2.
29
3029 Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347618303305>
31
3230 54. Everson TM, Marsit CJ, Michael O’Shea T, Burt A, Hermetz K, Carter BS, et al. Epigenome-wide
33
3431 Analysis Identifies Genes and Pathways Linked to Neurobehavioral Variation in Preterm Infants. *Sci*
35
3632 *Rep*. 2019;9:6322. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-42654-4>
37
3833 55. Jung M, Pfeifer GP. Aging and DNA methylation. *BMC Biol*. 2015;13:7. Available from:
39
4034 <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-015-0118-4>
41
42
4335 56. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*. New York, New
44
4536 York, USA: ACM Press; 2013;14:R115. Available from:
46
4737 <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
48
4938 57. Simpkin AJ, Hemani G, Suderman M, Gaunt TR, Lyttleton O, Mcardle WL, et al. Prenatal and
50
5139 early life influences on epigenetic age in children: a study of mother–offspring pairs from two cohort
52
5340 studies. *Hum Mol Genet*. 2016;25:191–201. Available from: [https://academic.oup.com/hmg/article-](https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddv456)
54
5541 [lookup/doi/10.1093/hmg/ddv456](https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddv456)
56
5742 58. Wallenborn JT., Levine; GA, Santos; AC dos, Grisi; S, Brentani; A, Fink G. Breastfeeding,
58
5943 Physical Growth, and Cognitive Development: Evidence From a Middle Income Country [Under
60
6144 review].

1
2
3
545 59. Hackshaw A. Small studies: strengths and limitations. *Eur Respir J*. 2008;32:1141–3. Available
4
546 from: <http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.00136408>
6
7
547 60. Jain A, Concato J, Leventhal JM. How Good Is the Evidence Linking Breastfeeding and
8
548 Intelligence? *Pediatrics*. 2002;109:1044–53. Available from:
10
549 <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.109.6.1044>
12
13
550 61. Li R, Scanlon KS, Serdula MK. The Validity and Reliability of Maternal Recall of Breastfeeding
14
1551 Practice. *Nutr Rev*. 2005;63:103–10. Available from:
16
1552 <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-lookup/doi/10.1111/j.1753-4887.2005.tb00128.x>
18
19
553 62. Greiner T. Exclusive breastfeeding: measurement and indicators. *Int Breastfeed J*. 2014;9:18.
20
21
554 Available from: [https://internationalbreastfeedingjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-](https://internationalbreastfeedingjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4358-9-18)
22
2355 4358-9-18
24
25
256 63. Burnham L, Buczek M, Braun N, Feldman-Winter L, Chen N, Merewood A. Determining Length
27
257 of Breastfeeding Exclusivity. *J Hum Lact*. 2014;30:190–4. Available from:
28
29
558 <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0890334414525682>
30
31
359 64. Bhaskaran K, Smeeth L. What is the difference between missing completely at random and missing
33
360 at random? *Int J Epidemiol*. 2014;43:1336–9. Available from: [https://academic.oup.com/ije/article-](https://academic.oup.com/ije/article-lookup/doi/10.1093/ije/dyu080)
35
361 [lookup/doi/10.1093/ije/dyu080](https://academic.oup.com/ije/article-lookup/doi/10.1093/ije/dyu080)
37
38
362 65. Bodner TE. What Improves with Increased Missing Data Imputations? *Struct Equ Model A*
39
4063 *Multidiscip J*. 2008;15:651–75. Available from:
41
4564 <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10705510802339072>
43
44
4565 66. Kang H. The prevention and handling of the missing data. *Korean J Anesthesiol*. 2013;64:402.
45
4666 Available from: <http://ekja.org/journal/view.php?doi=10.4097/kjae.2013.64.5.402>
47
48
4567
50
51
568
52
53
569
55
56
570
57
58
571
60
61
572
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Tables

Table 1. Sample characteristics (N = 70).

	Mean (SD) or n (%)	Minimum	Maximum
Maternal characteristics			
Age at delivery (years)	26.4 (6.6)	16	46
Pre-gestational body mass index (kg/m ²)	25.1 (5.4)	17.8	41.5
Weight gain during pregnancy (kg)	12.2 (5.7)	-9	23
Education			
Elementary or less	24 (34.3)	-	-
High school	39 (55.7)	-	-
Higher education	4 (5.7)	-	-
Socioeconomic status			
Low	12 (17.1)	-	-
Medium	36 (51.4)	-	-
High	9 (12.9)	-	-
Skin color			
White	52.4	-	-
Black/mixed	48.6	-	-
Child characteristics			
Sex (Female)	39 (55.7)	-	-
Birth weight (kg)	3.31 (0.49)	2.47	4.71
Weight-for-age z-score	0.20 (1.09)	-2.0	2.0
Length at birth (cm)	48.6 (2.17)	44	53
Length-for-age z-score	-0.28 (1.21)	-2.9	2.4
Cephalic circumference (cm)	34.4 (1.17)	32	38
Abdominal circumference (cm)	32.3 (2.14)	28	38
Thoracic circumference (cm)	33.2 (1.74)	30	38
Apgar 1-min	8.6 (1.69)	1	10
Apgar 5-min	9.9 (0.34)	8	10
Small-for-gestational-age	6 (8.6)	-	-
Gestational age (weeks)	39.39 (1.53)	34	42.4
DNAm gestational age (weeks)	38.70 (1.55)	34.2	42.3
Raw gestational age acceleration (weeks)	-0.69 (1.98)	4.88	4.40
Residual gestational age acceleration (weeks)	0.00 (1.52)	-4.16	3.82
Gestational age classification			
Preterm (< 37 weeks)	4 (5.7)	-	-
Term (≥37 and <41 weeks)	65 (92.9)	-	-
Post-term (≥ 42 weeks)	1 (1.4)	-	-

1				
2				
3	Age at 3-years follow-up (months)	43.70 (4.06)	36	52
4	Exclusive breastfeeding (months)	4.68 (1.45)	1	7
5				
6	Total breastfeeding (months)	10.32 (7.98)	1	47
7	PRIDI total score	35.87 (15.98)	0	58
8				
9	PRIDI standardized	0.00 (1.00)	-2.3	1.4
10	Weight-for-age z-score	-0.32 (1.33)	-3.9	2.7
11				
12	Height-for-age z-score	-1.06 (1.77)	-5.3	4.3
13				
14	Weight-for-height z-score	0.45 (1.21)	-2.3	2.9
15	HOME score	38.6 (9.34)	15	50

SD: Standard deviation; **Kg:** kilogram; **m²:** square meters; **cm:** centimeters.

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

1
2
596
597
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
598
599
600
19
20
601
21
22
602
24
603
25
604
27
605
28
606
29
307
31
608
32
609
34
610
35
611
36
612
38
613
39
614
41
615
42
616
43
617
45
618
46
619
48
620
49
621
50
622
52
623
53
624
55
625
56
626
587
59
628
60
61
62
63
64
65

Table 2. Association between maternal characteristics and the offspring DNAm gestational age (GA) at birth, and the raw and residual DNAm GA acceleration (GAA).

	DNAm GA	Raw GAA	Residual GAA
	β (95%CI) <i>p</i> -value	β (95%CI) <i>p</i> -value	β (95%CI) <i>p</i> -value
Age (year)	-0.01 (0.07; 0.05) 0.796	-0.05 (-0.13; 0.02) 0.163	-0.02 (-0.07; 0.04) 0.597
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	-0.04 (-0.12; 0.04) 0.283	-0.01 (-0.12; 0.10) 0.867	-0.04 (-0.12; 0.04) 0.362
Weight gain during pregnancy (kg)	-0.01 (-0.08; 0.06) 0.766	-0.04 (-0.14; 0.06) 0.472	-0.02 (-0.09; 0.06) 0.680
Education level	-0.11 (-0.76; 0.54) 0.732	0.19 (-0.63; 1.02) 0.639	-0.06 (-0.70; 0.59) 0.854
Socioeconomic status	-0.27 (-0.78; 0.23) 0.283	-0.35 (-1.00; 0.30) 0.286	-0.29 (-0.79; 0.22) 0.257
Skin color	0.40 (-0.34; 1.15) 0.282	-0.40 (-1.36; 0.56) 0.405	0.27 (-0.47; 1.00) 0.475

DNAm: DNA methylation; **GAA:** gestational age acceleration; **BMI:** Body Mass Index; **kg:** kilogram; **m²:** square meters. All models were adjusted for child's sex (pooled analysis).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 3. Association between newborn characteristics and DNAm gestational age (GA), raw GA acceleration (GAA), and residual GAA at birth.

	DNAm GA		Raw GAA		Residual GAA	
	β (95%CI)	<i>p</i> -value	β (95%CI)	<i>p</i> -value	β (95%CI)	<i>p</i> -value
Sex (female)	-0.14 (-0.89; 0.60)	0.704	-0.07 (-1.03; 0.89)	0.885	-0.13 (-0.87; 0.61)	0.726
Birth weight (kg)	0.00 (-0.00; 0.00)	0.872	-0.00 (-0.00; -0.00)	0.047	-0.00 (-0.00; 0.00)	0.761
Weight-for-age z-score	-0.13 (-0.48; 0.22)	0.470	0.09 (-0.36; 0.54)	0.680	-0.09 (-0.44; 0.26)	0.609
Birth length (cm)	0.14 (-0.04; 0.33)	0.133	-0.07 (-0.31; 0.17)	0.577	0.11 (-0.08; 0.28)	0.259
Length-for-age z-score	0.14 (-0.18; 0.46)	0.384	0.42 (0.02; 0.83)	0.040	0.19 (-0.13; 0.50)	0.235
Cephalic circumference (cm)	-0.05 (0.39; 0.29)	0.766	-0.25 (-0.68; 0.19)	0.258	-0.08 (-0.42; 0.25)	0.616
Abdominal circumference (cm)	0.03 (-0.21; 0.15)	0.755	-0.15 (-0.37; 0.08)	0.199	-0.05 (-0.23; 0.13)	0.583
Thoracic circumference (cm)	-0.01 (-0.24; 0.21)	0.900	-0.31 (-0.58; -0.03)	0.030	-0.06 (-0.28; 0.15)	0.558
Apgar 1-min	0.02 (-0.20; 0.24)	0.878	-0.13 (-0.41; 0.15)	0.365	-0.01 (-0.23; 0.21)	0.941
Apgar 5-min	-0.30 (-1.38; 0.79)	0.587	-0.47 (-1.86; 0.92)	0.503	-0.33 (-1.39; 0.74)	0.544
Small-for-gestational-age	0.17 (-1.18; 1.51)	0.806	-0.13 (-1.86; 1.59)	0.876	0.11 (-1.22; 1.44)	0.865
GA classification						
Preterm (< 37 weeks)	-1.59 (-3.13; -0.04)	0.045	2.57 (0.59; 4.56)	0.012	-0.87 (-2.44; 0.70)	0.273
Term (≥ 37 and <41 weeks)	Ref.		Ref.		Ref.	
Post-term (≥ 42 weeks)	2.42 (-0.63; 5.48)	0.117	-0.40 (-4.31; 3.52)	0.841	1.94 (-1.15; 5.04)	0.215

DNAm: DNA methylation; **GAA:** gestational age acceleration; **kg:** kilogram; **cm:** centimeters; **β :** beta coefficient; **CI:** Confidence Interval. All models were adjusted for child's sex (pooled analysis) unless when the outcome is sex.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 4. Associations between DNAm gestational age (GA), raw and residual GA acceleration (GAA) at birth, and child’s PRIDI standardized score at 3-years follow-up, and the interaction between exposures and exclusive breastfeeding (EBF).

PRIDI standardized score: Dependent variable	Model 1 ^a		Model 2 ^b	
	β (95%IC)	<i>p</i> -value	β (95%IC)	<i>p</i> -value
DNAm GA (weeks)	0.09 (-0.08; 0.25)	0.297	0.11 (-0.04; 0.27)	0.155
EBF (months)	0.22 (0.01; 0.44)	0.043	0.09 (-0.15; 0.34)	0.444
SES			Ref.: Low	
Medium			-0.01 (-0.67; 0.64)	0.962
High			0.57 (-0.13; 1.27)	0.107
HOME			0.04 (0.00; 0.07)	0.049
<i>DNAm GA × EBF</i>			0.04 (-0.10; 0.18)	0.596
Raw GAA (weeks)	0.02 (-0.11; 0.15)	0.752	0.05 (-0.09; 0.18)	0.512
EBF (months)	<i>0.21 (-0.00; 0.43)</i>	<i>0.052</i>	0.09 (-0.16; 0.34)	0.481
SES			Ref.: Low	
Medium			-0.01 (-0.68; 0.65)	0.965
High			0.53 (-0.18; 1.25)	0.139
HOME			0.04 (0.00; 0.08)	0.046
<i>DNAm GA × EBF</i>			0.02 (-0.10; 0.14)	0.759
Residual GAA (weeks)	0.08 (-0.09; 0.24)	0.342	0.11 (-0.06; 0.28)	0.405
EBF (months)	0.22 (0.01; 0.44)	0.045	0.09 (-0.16; 0.34)	0.452
SES			Ref.: Low	
Medium			-0.01 (-0.67; 0.65)	0.973
High			0.57 (-0.13; 1.28)	0.107
HOME			0.04 (0.00; 0.07)	0.046
<i>DNAm GA × EBF</i>			0.03 (-0.12; 0.18)	0.669

Results are from multiply imputed data; ^a Model 1 adjusted for child’s sex (pooled analysis) and age of assessment; ^b Model 2 covariates of Model 1 + maternal age; **DNAm**: DNA methylation; **GA**: Gestational age; **GAA**: gestational age acceleration; **EBF**: Exclusive breastfeeding; **SES**: Socioeconomic status; **β** : beta coefficient; **CI**: Confidence Interval. β refers to the regression coefficient from linear regression analysis, indicating SD change in PRIDI scores per unit of change in the covariable.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 5. Associations between DNAm gestational age (GA), raw and residual GA acceleration (GAA) at birth, and child’s PRIDI standardized score at 3-years follow-up, and the interaction between exposures and total breastfeeding (TBF).

PRIDI standardized score: Dependent variable	Model 1 ^a		Model 2 ^b	
	β (95%IC)	p-value	β (95%IC)	p-value
DNAm GA (weeks)	0.06 (-0.10; 0.21)	0.485	0.12 (-0.04; 0.28)	0.139
TBF (months)	0.03 (-0.01; 0.07)	0.112	0.02 (-0.02; 0.07)	0.248
SES			Ref.: Low	
Medium			0.11 (-0.52; 0.74)	0.722
High			0.72 (0.07; 1.38)	0.031
HOME			0.04 (0.00; 0.07)	0.034
<i>DNAm GA × EBF</i>			0.01 (-0.02; 0.04)	0.474
Raw GAA (weeks)	0.02 (-0.11; 0.14)	0.802	-0.05 (-0.08; 0.19)	0.411
TBF (months)	0.03 (-0.01; 0.07)	0.115	0.02 (-0.02; 0.07)	0.270
SES			Ref.: Low	
Medium			0.11 (-0.52; 0.75)	0.720
High			0.69 (0.02; 1.36)	0.044
HOME			0.04 (0.00; 0.07)	0.032
<i>DNAm GA × TBF</i>			0.00 (-0.02; -0.03)	0.679
Residual GAA (weeks)	0.05 (-0.11; 0.22)	0.518	0.12 (-0.05; 0.28)	0.156
EBF (months)	0.03 (-0.01; 0.07)	0.114	0.23 (-0.02; 0.06)	0.262
SES			Ref.: Low	
Medium			0.11 (-0.52; 0.74)	0.719
High			0.73 (0.06; 1.39)	0.032
HOME			0.04 (0.00; 0.07)	0.032
<i>DNAm GA × EBF</i>			0.01 (-0.02; 0.04)	0.500

Results are from multiply imputed data; ^a Model 1 adjusted for child’s sex (pooled analysis) and age of assessment; ^b Model 2 covariates of Model 1 + maternal age; **DNAm**: DNA methylation; **GA**: Gestational age; **GAA**: gestational age acceleration; **EBF**: Exclusive breastfeeding; **SES**: Socioeconomic status; **β**: beta coefficient; **CI**: Confidence Interval. β refers to the regression coefficient from linear regression analysis, indicating SD change in PRIDI scores per unit of change in the covariable.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figures Legend

Figure 1. Association between raw gestational age (GA) acceleration (GAA) and birth weight (panel a), length-for-age z-score (panel b), thoracic circumference (panel c) and a Box-plot with the distribution of raw GAA according to the chronological GA classification (panel d).

Supplementary Material

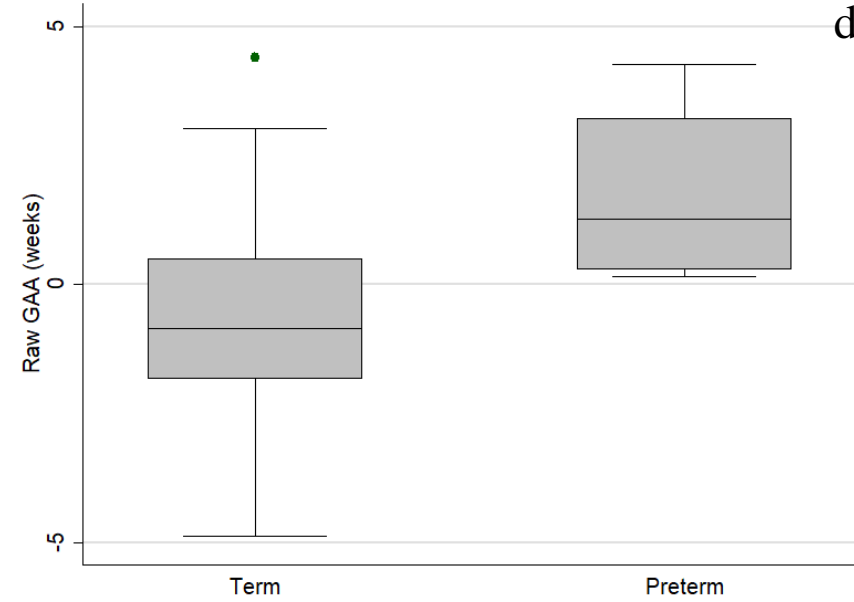
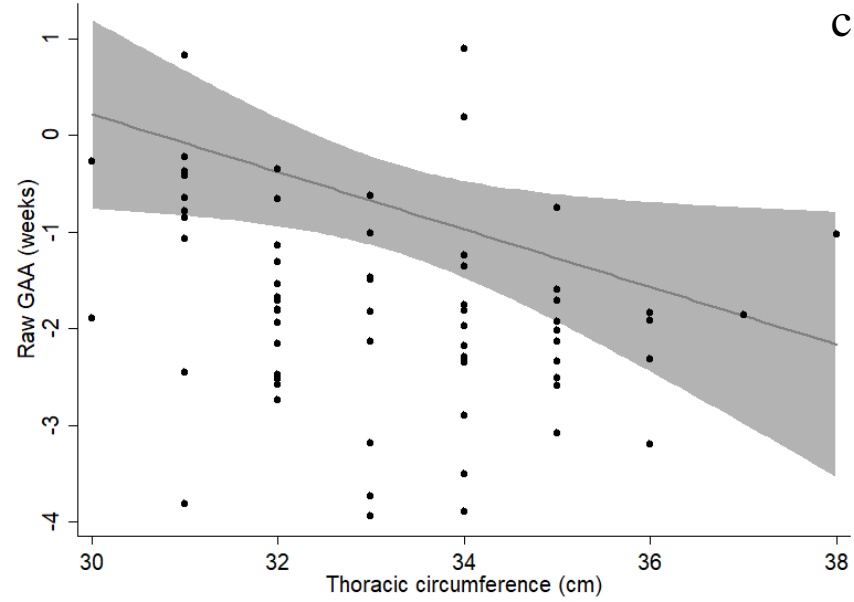
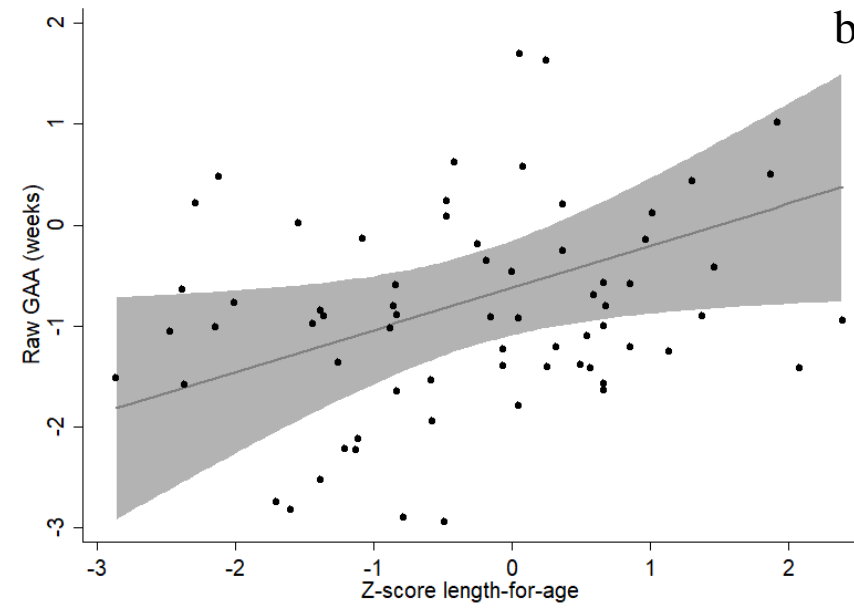
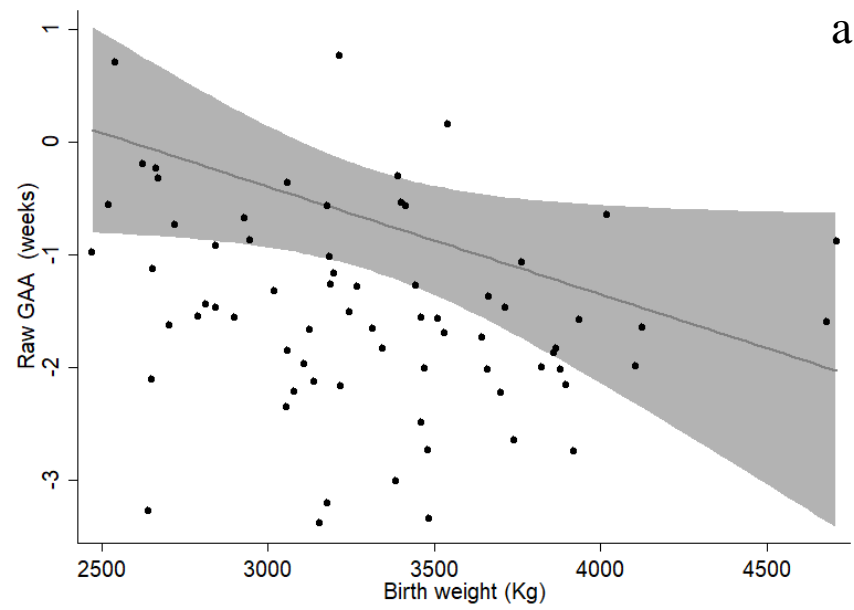
Supplementary file 1: Flowchart

Supplementary file 2: Multiple imputations

Table S1. Missingness among variables used in the multiple imputation models.

Additional file 3:

Table S2. Differences between the final sample and those excluded or did not participate in the 3-years follow-up.







Click here to access/download
Supplementary Material
Supplementary file 2.docx



BMC Public Health

Associations between neighborhood violence during pregnancy and birth outcomes: Evidence from São Paulo's Western Region Birth Cohort --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PUBH-D-20-04012	
Full Title:	Associations between neighborhood violence during pregnancy and birth outcomes: Evidence from São Paulo's Western Region Birth Cohort	
Article Type:	Research article	
Section/Category:	Social determinants of health	
Funding Information:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (001)	Miss Angelica Carreira dos Santos
Abstract:	<p>Background</p> <p>Low birth weight and prematurity remain leading causes of infant mortality and morbidity globally. Although an extensive literature has highlighted the importance of socioenvironmental characteristics for birth outcomes, the role of indirect violence on health remains fairly understudied.</p> <p>Methods</p> <p>Using geocoded birth records from the ongoing Western Region Birth Cohort (Região Oeste Coorte – ROC-Cohort) of infants born between 2012-2014 and geocoded crime reports, we assessed the associations between exposure to violent crimes during pregnancy within a 1-km radius of mother's residence and low birth weight, preterm delivery, and being born small-for-gestational-age. Violent crime exposure was categorized into quintiles. Multivariate logistic regressions were used to examine the associations between violence exposure and birth outcomes. Models were adjusted for sex, maternal age and education, socioeconomic status, and risk factors such as hypertension, diabetes, smoking, and drinking during pregnancy.</p> <p>Results</p> <p>Among the 5,268 infants included, the average crime exposure during the first two trimesters of pregnancy ranged from 0.44 violent crimes in the least exposed quintile to 12.74 crimes in the most exposed. Compared to children with the lowest violence exposure, children in the highest exposure quintile were at higher odds of being born small-for-gestational-age (1.41[1.06-1.89]), preterm (1.35[1.01-1.80]), and low birth weight (1.42[1.03-1.98]). While socioeconomic status and maternal education were positively associated with lower violence exposure, no associations were found between these characteristics and the birth outcomes.</p> <p>Conclusions</p> <p>Higher exposure to external violent crimes in the close vicinity are associated with substantial increases in the odds of adverse birth outcomes. Policies to improve neighborhood safety can contribute not only to the short-term well-being of populations but may also have large social, economic, and health benefits in the long run.</p>	
Corresponding Author:	Angelica Carreira dos Santos Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina Sao Paulo, SP BRAZIL	
Corresponding Author E-Mail:	angelica.carreira@usp.br;angelica.carreira@gmail.com	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina	

Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Angelica Carreira dos Santos
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Angelica Carreira dos Santos
	Alexandra Brentani, PhD
	Günther Fink, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Has this manuscript been submitted before to this journal or another journal in the BMC series</ a>?	No

[Click here to view linked References](#)

1 **Title:** Associations between neighborhood violence during pregnancy and birth outcomes: Evidence
2 from São Paulo's Western Region Birth Cohort

3
4 3
5
6

7 4 **Authors:** Angelica Carreira dos Santos¹, Alexandra Brentani¹, Günther Fink²

8
9
10 5
11
12

13
14 6 **Author Affiliations:**

15
16
17 7

¹ Department of Pediatrics, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

18
19
20 8

² Swiss Tropical and Public Health Institute, Department of Epidemiology and Public Health

21
22 9
23

University of Basel, Basel, Switzerland

24
25 10
26

27
28
29 11 **Corresponding author:**

30
31
32 12

Angélica Carreira dos Santos, Department of Pediatrics, University of São Paulo, Medical School,

33
34 13
35

Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 647, São Paulo, CEP-01246-904, Brazil

36
37 14
38

e-mail: angelica.carreira@usp.br

39
40 15
41

42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

16 **ABSTRACT**

1
217 **Background:** Low birth weight and prematurity remain leading causes of infant mortality and
3
418 morbidity globally. Although an extensive literature has highlighted the importance of
5
619 socioenvironmental characteristics for birth outcomes, the role of indirect violence on health
8
920 remains fairly understudied.

10
11
1221 **Methods:** Using geocoded birth records from the ongoing Western Region Birth Cohort (*Região*
13
14
1522 *Oeste Coorte* – ROC-Cohort) of infants born between 2012-2014 and geocoded crime reports, we
16
1723 assessed the associations between exposure to violent crimes during pregnancy within a 1-km
18
19
2024 radius of mother’s residence and low birth weight, preterm delivery, and being born small-for-
21
2225 gestational-age. Violent crime exposure was categorized into quintiles. Multivariate logistic
23
2426 regressions were used to examine the associations between violence exposure and birth outcomes.
25
26
2727 Models were adjusted for sex, maternal age and education, socioeconomic status, and risk factors
28
2928 such as hypertension, diabetes, smoking, and drinking during pregnancy.

30
31
3229 **Results:** Among the 5,268 infants included, the average crime exposure during the first two
33
34
3530 trimesters of pregnancy ranged from 0.44 violent crimes in the least exposed quintile to 12.74
36
3731 crimes in the most exposed. Compared to children with the lowest violence exposure, children in
38
39
4032 the highest exposure quintile were at higher odds of being born small-for-gestational-age
41
4233 (1.41[1.06-1.89]), preterm (1.35[1.01-1.80]), and low birth weight (1.42[1.03-1.98]). While
43
44
4534 socioeconomic status and maternal education were positively associated with lower violence
46
4735 exposure, no associations were found between these characteristics and the birth outcomes.

48
4936 **Conclusions:** Higher exposure to external violent crimes in the close vicinity are associated with
50
51
5237 substantial increases in the odds of adverse birth outcomes. Policies to improve neighborhood safety
53
54
5538 can contribute not only to the short-term well-being of populations but may also have large social,
56
5739 economic, and health benefits in the long run.

58
5940 **Keywords:** Violence; pregnancy; child health; birth weight; social determinants of health.

41 Background

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Low birth weight accounts for more than 80% of all neonatal mortality globally [1]. In 2015, more than 1 million children under 5 died because of preterm birth complications globally [2]. Neonates born with low birth weight – about two-thirds of which are preterm [1] - face higher morbidity risks, increased risk of stunting, increased risk of long-term development impairment, as well as increased vulnerability to chronic disease [1–7].

Violence is a growing public health concern with immediate and long-term influences on population health [8–10]. Contrary to some positive trends observed in high-income countries (HIC) in recent years [10], homicide rates have been increased in Latin America over the past years [11]. An estimated homicide rate of 28.5 implies that crime rates in Latin America are 8 times higher than those seen in HICs on average, and 14 times those seen in low-middle-income countries (LMICs) in the Western Pacific Region [11].

Exposure to violence has been consistently associated with mental health problems and high-risk behaviors such as alcohol, smoking, and drug abuse, which threaten the wellbeing of both adult and child populations [9,12,13]. Fear of crime can also trigger anxiety and feelings of isolation, victimization, powerlessness, and normlessness [14], particularly among women [15]. Chronic exposure to such environmental stress can trigger neural or neuroendocrine responses, change the functioning of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and lead to increased allostatic load [16].

A growing body of literature has also tried to link the area-level effects of external violence to adverse birth outcomes [17–26]. The large majority of studies are based on neighborhood comparisons in the United States, and likely allow only limited insight into the impact of violence in low-income settings due to the large structural differences in neighborhoods as well as public support systems. The few studies that have been conducted in low-income and high crime exposure areas have mostly focused on sociopolitical violence, and generally found sizeable increases in

66 adverse birth outcomes in response to major violence outbreaks [17,20,27,28]. This is consistent
167 with other studies focusing on more extreme forms of violence, such as terrorist attacks and
2
3
4 68 civil/war conflicts, finding large increases in the risk of pregnancy complications outcomes after
5
69 such major events [17,29].
7
8

970 We aim to explore the relationship between exposure to violent crime in close vicinity and
10
11
12 71 three of the most common adverse birth outcomes: preterm birth, small-for-gestational-age, and low
13
14 72 birth weight in one of the largest metropolitan areas of the world [30]. Using a novel data set, we
15
16 73 aim to fulfill the gap in the literature that investigates the underlying consequences of violent crimes
17
18
19 74 in the health of pregnant women and their offspring in a low-income population. Our initial
20
21 75 hypothesis is that violent crime close to home is associated with these adverse birth outcomes,
22
23
24 76 independent of maternal and socioenvironmental characteristics.
25
26
27 77
28
29

3078 **Methods**

3379 *Study design*

3680 This study was designed as a retrospective cross-sectional study linking data collected as
37
38
39 81 part of a prospective cohort study to geocoded administrative data on violent crime.
40
41

4282 *Study Setting*

4583 This study was conducted in São Paulo, Brazil. Like other LMICs, Brazil has experienced a
46
47 84 rapid and mostly unmanaged urbanization process in the past decades, accompanied by large
48
49
50 85 increases in social and economic inequality [31,32]. The rates of homicides in Brazil have been
51
52 86 rising steadily over the past years, reaching a record level of 31.6 homicides per 100,000 inhabitants
53
54
55 87 in 2017 [33]. With 10.3 homicides per 100,000 inhabitants, São Paulo municipality had one of the
56
57 88 lowest homicide rates in Brazil in 2017 overall, but very high rates in areas of low socioeconomic
58
59
60
61
62
63
64
65

89 development [33]. In the Western Region of São Paulo, where this study was conducted, homicide
90 rates ranged in its neighborhoods between 5 and 20 homicides per 100,000 inhabitants [34].

92 ***Study Population***

93 The Western Region Birth Cohort (*Região Oeste Coorte – ROC-Cohort*) enrolled all locally
94 resident infants born at the University Hospital of the School of Medicine of the University of São
95 Paulo between April 1, 2012, and March 31, 2014. A total of 6,207 mother-child pairs were
96 enrolled in the cohort. The cohort is still active, with children currently under the 72 months follow-
97 up.

98 ***Data***

99 Hospital electronic birth records were available for all children in the cohort. The electronic
100 medical registry includes birth characteristics such as type of delivery, gestational length, weight at
101 birth, and others. During the postpartum hospital stay, trained interviewers administered structured
102 questionnaires to collect information on socio-demographic characteristics and health during
103 pregnancy to a subset of mothers. The questionnaire can be found in the **Supplementary file 1**.

104 ***Outcomes***

105 The analysis focused on three adverse birth outcomes: low birth weight (LBW), preterm
106 delivery (PT), and small-for-gestational-age (SGA). Birth weight and length were measured by the
107 Hospital's neonatology team immediately after birth using standard hospital equipment. Gestational
108 length in weeks was estimated using the New Ballard Score [35]. LBW was defined as birth weight
109 < 2,500 grams, and SGA was defined as weight-for-gestational age < 10th percentile based on the
110 Intergrowth-21th growth reference tables [36].

111 ***Exposure – violence in the neighborhood***

112 Data on violence is routinely collected and made publicly available by the Secretariat of
113 Public Safety of the State of São Paulo (www.ssp.sp.gov.br). The system collects detailed
114 information about willful murder, femicide, robbery followed by death, bodily injury followed by
115 death, death resulting from police intervention, suspicious death, fatal vehicle accidents, and mobile
116 theft. Each reported incident record contains the date, time, and address of the crime. Following
117 most of the external violence literature, we focused on violent crime in our analysis, which includes
118 willful murder, robbery followed by death, bodily injury followed by death and death resulting from
119 police intervention, but excludes other crimes such as robberies without injuries.

120 We extracted data on violent crimes between 2011 and 2014 to cover the pregnancy period
121 of all ROC-Cohort children. The address of each reported crime was geocoded with latitude and
122 longitude coordinates using the ggmap package [37], and a point-layer for each time point (month-
123 year) was generated using R map tools [38]. The maternal residential address was collected at birth
124 and geocoded as an additional point-layer. Each residential address was treated as a centroid point.
125 We then computed the number of crimes within a 1-kilometer spatial buffer by day, month and
126 year. Exposure to violence during pregnancy was estimated as the sum of violent crimes in the first
127 two trimesters of pregnancy. Violence in the third trimester was not considered because total
128 exposure to violence after week 24 of gestation directly depends on gestational length (the outcome
129 variable). Violence exposure during the first two trimesters was then divided into five equally sized
130 quintiles for analysis.

131 *Statistical analyses*

132 We first compute the average number of crimes for each of the exposure quintiles. Next, we
133 tested crude associations of exposure to violence quintiles with each outcome (LBW, SGA, and PT
134 birth). In the fully adjusted multivariable models, we included all covariates highlighted in the
135 extant literature as risk factors for adverse birth outcomes, including maternal age (<20, >=35),
136 educational level, alcohol consumption, diabetes and hypertension during pregnancy, and

137 socioeconomic (SES) index. The construction of a socioeconomic (SES) index was based on the
138 approach proposed by Vyas and Kumaranayake [39], which relies on the use of principal
139 component analysis (PCA) to the selected variables. The SES index variable describes the SES
140 status based on questions about ownership of durables, income, and house characteristics. The
141 resulting SES index was then divided into quintiles - low, medium-low, medium, medium-high, and
142 high SES status. Age was measured as a continuous variable but categorized in the adjusted model
143 to take into account the risks of pregnancy in different ages range (adolescence, adulthood, and after
144 35 years old).

145 Given that the postpartum questionnaire was only available for a subsample of children, we
146 initially screened the dataset for missing data and patterns of non-responsiveness in the postpartum
147 questionnaire using t-test and chi-square to test if the assumptions of missing at random (MAR)
148 were met. We implemented multiple imputations by chained equations (MICE) with a fully
149 conditional specification of prediction equations using variables that potentially predicted non-
150 response or the outcome. The MICE method accounts for statistical uncertainty in the imputations,
151 resulting in more plausible imputes, and hence more reliable inferences in complex settings. Further
152 details on these imputations are provided in the **Table S1** (Supplementary file 2). All analyses were
153 performed using Stata version 14 [40] and R version 3.6.1 [38].

154 **Results**

155 Among the 6,207 children in the ROC-Cohort, 44 were stillbirths and excluded from the
156 analysis. Stillbirth was not associated with violence exposure during pregnancy in our sample (0.99;
157 95%CI: 0.92-1.06). Additionally, 895 mother-child dyads were excluded due to an invalid address.
158 Overall, 5,268 children and their mothers met the inclusion criteria for this study. Mothers who did
159 not respond to the postpartum questionnaire did not differ from those who completed the survey
160 regarding the type of birth, gestational length category, birth weight and length, and child sex.

162 398 (7.8%) births were classified as SGA, 369 (7.0%) as PT, and 355 (6.7%) as LBW.

163 **Table 1** shows the frequency of each type of crime during pregnancy by exposure quintile. During
2
3
164 the first two trimesters, the mean number of crimes exposition within a 1-kilometer from home was
4
5
165 4.2 (SD \pm 4.8). The large majority of violent crimes were classified as murders; death resulting
7
166 from policy intervention was the second most common type of violent crime. Women with the
9
10
167 lowest exposure in the sample (quintile 1) were exposed to 0.45 (SD \pm 0.5) violent crimes on
12
168 average. Only 19% of women did not experience any exposition to violent crimes in their vicinity
14
169 during the first two trimesters. In the fifth quintile, women were exposed on average to 12.7 (SD \pm
17
170 4.5) violent crimes, with some women experiencing more than 30 violent crimes during the first
19
171 two trimesters.
21
22
23

24
25
26 **Table 1 (here)**
27
28
29
30
31

32
33 **Figure 1** shows the geographic distribution of the outcomes and violent crimes in the
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

Areas on the first, third, and fifth quintile of violent crimes had 6.7%, 7.9%, and 9.5% of SGA children, 6.5%, 6.4%, and 6.3% of PT, and 5.4%, 7% and 7.5% of born LBW children, respectively. **Table 2** shows the distribution of SGA, PT, and LBW birth outcomes by exposure quintile. In bivariate analysis, LBW was strongly associated with crime exposure (1.09; 95%CI: 1.02-1.17, $p=0.014$), while PT and SGA displayed positive but not statistically significant associations with violent crimes. Upper middle (0.91; 95%CI: 0.85-0.98, $p=0.013$) and high (0.83; 95%CI: 0.77-0.89, $p<0.001$) SES status was negatively associated with violent crimes. Physical abuse was also negatively associated with violence (0.79; 95%CI: 0.66-0.95, $p=0.013$).

188 **Table 2 (here)**

2

3

189 4

5

190 6

7

191 8

9

10

192 11

12

193 13

14

15

194 16

17

195 18

19

196 20

21

22

197 23

24

198 25

26

27

199 28

29

200 30

31

201 32

33

202 34

35

203 36

37

204 38

39

205 40

41

206 42

43

44

45

207 46

47

48

208 49

50

51

209 52

53

54

55

210 56

57

58

59

211 60

61

62

63

64

65

Figure 2 shows the bivariate relationship between exposure to violent crime and the proportion of infants born SGA (panel a), preterm (panel b) and LBW (panel c). **Table 3** shows the unadjusted and adjusted associations between violent crime exposure during pregnancy and adverse birth outcomes. Relative to children from the lowest violence quintile, living in the highest violence quintile was associated with a 46% increase in the odds of SGA in the unadjusted model (1.46; 95%CI: 1.10-1.93). After adjustment for covariates, risk factors and SES status, the estimated odds ratio (OR) slightly decreased (1.41; 95%CI: 1.06-1.89). In the adjusted model, PT birth odds increased nonlinearly (Figure 2) with violence exposure, varying the estimated ORs from 1.16 (95%CI: 0.84-1.59) on quintile 2, 1.35 (95%CI: 1.01-1.80) on quintile 4, and 1.01 (95%CI: 0.72-1.40) on quintile 5. The estimated risk of LBW increased almost linearly with exposure quintiles, with an estimated OR of 1.43 (95%CI: 1.03-1.98) for the top quintile. In terms of the included covariates, smoking during pregnancy was the most consistent risk factor for all birth outcomes analyzed in this study, with estimated ORs of 1.83 for SGA (95%CI: 1.32-2.55), 2.04 for PT birth (95%CI: 1.47-2.82), and 2.89 for LBW (95%CI: 2.07-4.03). Physical abuse during pregnancy more than doubled the odds for LBW (2.12; 95%CI: 1.03-4.36, $p = 0.042$). SES and maternal education were not associated with the outcomes in our analysis.

207 **Table 3 (here)**

50

51

208 52

53

54

209 55

56

57

210 58

59

211 60

61

62

63

64

65

209 **Discussion**

In this study, we use a novel data set from Brazil to explore the empirical associations between neighborhood-level exposure to violent crime and birth outcomes. Our study yields three

212 main findings: first, exposure to violent crimes is very high among pregnant women in the urban
213 areas studied. Based on the São Paulo estimated population by the Brazilian Institute of Geography
214 and Statistics, and violent crimes reports extracted by us from the Secretariat of Public Safety of the
215 State of São Paulo, from 2011 to 2014, there were on average 2.87 violent crimes per 10,000
216 inhabitants in the city of São Paulo and an average of 3.62 violent crimes per 10,000 inhabitants in
217 the study area. While these numbers may be somewhat abstract, they imply that each person living
218 in a densely populated area like the one studied - with an estimated density of 7,770 inhabitants per
219 km² - experiences, on average, 0.94 violent crimes per month within 1-km walking distance from
220 home. For the average pregnant mother, this implies 5.6 crimes in close vicinity within the first six
221 months of pregnancy. Even mothers will, with all likelihood, personally witness only a small
222 fraction of these events, the threat of external violence is without any doubt real and constantly
223 present.

224 Second, our results suggest that external violence should not be interpreted as homogeneous
225 characteristics of entire cities or larger census tracts, but something that is highly heterogeneous
226 within relatively small spatial areas. As shown in **Figure 1**, the distance between some of the safest
227 and some of the most violent exposed neighborhoods is less than 2km, highlighting the remarkable
228 small scale at which urban disparities can be detected.

229 Third, and maybe most importantly, we found that exposure to crime is associated with
230 substantial increases in SGA, PT, and LBW even after controlling for SES status and maternal
231 education, which is somehow surprising. Our findings that violence increases adverse birth
232 outcomes are consistent with a previous municipality-level comparison from Brazil [20] and
233 highlight the critical long-run consequences of violence beyond the immediate impact on the
234 directly affected population. However, in their study, the authors found a pronounced difference
235 among children of poorly educated mothers, suggesting that violence is only a component of the
236 disadvantages that these children are exposed to as a result of low SES [20]. Similarly, another

237 study found that neighborhood-level socio-economic-related risks have direct effects on LBW and
238 PT, these effects are mediated by personal-level risks such as SES status [42].

239 The general literature on violence exposure and birth outcomes has been more mixed with
240 some studies such as Messer et al. [19] finding no associations with adverse birth outcomes and
241 others such as Goin et al. [22] finding only an association between first-trimester exposure and
242 SGA. While several theoretical mechanisms highlighted in the literature and introduction of this
243 paper seem consistent with the results presented here, we do not have data to directly investigate
244 mechanisms such as blood pressure increases [43] and anxiety [44] highlighted in the literature.
245 HPA axis activation would be consistent with the PT delivery increase documented in several
246 epidemiological studies [45–49]. It is also possible that heightened maternal cortisol levels may lead
247 to an increased placental corticotrophin-release [45,49,50]. Although placental enzymes protect the
248 fetus from increased maternal cortisol levels in principle, animal studies suggest that prenatal stress
249 can affect the placental activity and in utero enzyme expression [51,52].

250 It is expected that by 2050 more than a billion children will be living in urban areas [53].
251 Rapid rates of urbanization combined with increasing economic inequalities are likely to trigger
252 increased rates of violent crime in many settings, especially in areas where access to basic education
253 and health care services remains limited [53,54]. Intersectoral strategies to decrease violence are
254 urgently needed, and health programs must be improved to support victims of all kinds of violence.

255 **Limitations**

256 The analysis presented in this paper has some limitations. Although violence exposure
257 during the third trimester of pregnancy is likely to trigger adverse birth outcomes, our study only
258 considered violence exposure during the first two trimesters of pregnancy. The primary reason for
259 this was the presence of early preterm children (24-28 gestational weeks) in our sample, which did
260 not allow us to compute third-trimester exposure variables. Excluding these cases, or computing
261 only partial exposures would likely have resulted in substantial estimation bias. It is also not clear
262 how complete the violence data is. The National System of Statistics on Public Security and

263 Criminal Justice [54] classifies each State as having low, medium, or high-quality data, according to
264 the extent of its data coverage and the proportion of deaths with undetermined causes, and São
265 Paulo is in the high-quality group data. It is possible that our data still underestimates the number of
266 crimes in the area because of non-reported or non-registered crimes; we believe that this type of
267 measurement error should, however, be small in the setting studied.

269 **Conclusions**

270 The results presented in this paper suggest that exposure to external violent crime is
271 associated with substantial increases in small-for-gestational-age, preterm and low birth weight
272 births. Actions to prevent violence or to reduce its impacts need to be implemented to improve
273 neighborhood safety and to reduce inequalities among disadvantaged populations may have large
274 long-term benefits on population health and wellbeing.

276 **List of abbreviations**

277 HIC: High-income countries

278 LMICs: Low-middle-income countries

279 ROC-Cohort: Western Region Birth Cohort (*Região Oeste Coorte*)

280 LBW: Low birth weight

281 PT: Preterm delivery

282 SGA: Small-for-gestational-age

283 SES: Socioeconomic status

284 PCA: Principal component analysis

285 MICE: Multiple imputations by chained equations

1
286 95%CI: 95% confidence interval

3
4
287 SD: Standard deviation

6
7
288 OR: Odds ratio

9
10
1289
12
13
14
290 **Declarations**

15
16
17
291 ***Ethics approval and consent to participate***

18
19
20
292 The Ethics Committee for the Analysis of Research Projects (*Comissão de Ética para*
21
22
293 *Análise de Projetos de Pesquisa, CAPPesq*) of the University Hospital of the School of Medicine of
24
25
294 the University of São Paulo (HCFMUSP) approved this study under protocol number:
26
27
295 01604312.1.0000.0065. All mothers who agreed to participate in the ROC-Cohort signed the
29
296 consent form after being informed about the study and after all questions were answered by trained
31
32
297 interviewers.

34
35
36
37
38
299 ***Consent for publication***

40
41
300 Not applicable.

43
44
45
301
46
47
48
302 ***Availability of data and materials***

49
50
51
303 The violence information used in this study is publicly available at the Secretariat of Public
52
53
304 Safety of the State of São Paulo webpage: www.ssp.sp.gov.br. The individual data that support the
55
56
305 findings of this study include personal information such as residential address and health-related
57
58
306 data. Therefore, the data are not publicly available. The data can be made available upon reasonable

60
61
62
63
64
65

307 request to the corresponding author after obtaining permission from the University Hospital of the
308 School of Medicine of the University of São Paulo's Ethics board in accordance with the ethics
2
3
309 policy statements related to the study protocol.
4
5

310
7

8
9

10 ***Competing Interests***

11

12 The authors declare that they have no competing interests.
13
14

15

16
17

18

19 ***Funding***

20

21

22 This study was financed in part by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de*
23

24 *Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.* The funding agency had no role in the
25

26 analysis, collection, and interpretation of data, nor did it in the writing process.
27
28

29

30
31

32

33 ***Author's contributions***

34

35
36

37 ACS, AB, and GF contributed to the conception and design of the study. ACS coded the
38

39 exposure data collection and geocoding, designed the maps, tables and figures, performed the
40

41 statistical analysis and drafted the manuscript. AB, as the principal investigator of the ROC cohort,
42

43 coordinated and supervised data collection, contributed to the analysis and interpretation of the
44
45

46 results, and critically reviewed the manuscript. GF supervised data collection, cleaned the data,
47
48

49 provided the analysis plan, contributed to the analysis and interpretation of the results, and critically
50

51 reviewed the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.
52
53

54

55
56

57

58
59

60

61

62

63

64
65

329 **Acknowledgments**

1
2 Not applicable.
3
4

5
6
7
8 **References**
9

- 10
11
12 333 1. Blencowe H, Krasevec J, de Onis M, Black RE, An X, Stevens GA, et al. National, regional, and
13 334 worldwide estimates of low birthweight in 2015, with trends from 2000: a systematic analysis.
14 335 Lancet Glob Heal. 2019;7:e849–60. doi:10.1016/S2214-109X(18)30565-5
15 336
16 337 2. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller A-B, Lumbiganon P, Petzold M, Hogan D, et al. Global,
17 338 regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and
18 339 modelling analysis. Lancet Glob Heal. 2019;7:e37–46. doi:10.1016/S2214-109X(18)30451-0
19 340
20 341 3. Barker DJ, Osmond C. Infant Mortality, Childhood Nutrition, and Ischaemic Heart Disease in
21 342 England and Wales. Lancet. 1986;1:1077–81. doi:10.1016/s0140-6736(86)91340-1
22 343
23 344 4. Kramer MS. Determinants of low birth weight : methodological assessment and meta-analysis /
24 345 M. S. Kramer. Bull World Heal Organ 1987; 65(5) 663-737. 1987;
25 346
26 347 5. Seckl JR, Holmes MC. Mechanisms of Disease: glucocorticoids, their placental metabolism and
27 348 fetal “programming” of adult pathophysiology. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2007;3:479–88.
28 349 doi:10.1038/ncpendmet0515
29 350
30 351 6. O’Donnell K, O’Connor TG, Glover V. Prenatal Stress and Neurodevelopment of the Child:
31 352 Focus on the HPA Axis and Role of the Placenta. Dev Neurosci. 2009;31:285–92.
32 353 doi:10.1159/000216539
33 354
34 355 7. Lewis AJ, Austin E, Galbally M. Prenatal maternal mental health and fetal growth restriction: a
35 356 systematic review. J Dev Orig Health Dis. 2016;7:416–28. doi:10.1017/S2040174416000076
36 357
37 358 8. World Health Assembly 49. Prevention of violence: public health priority. World Health
38 359 Organization; 1996;(Agenda item 30.2).
39 360
40 361 9. Krug EG et al., eds. World report on violence and health. Geneva, World Health Organization,
41 362 2002.
42 363
43 364 10. World Health Organization. Global status report on violence prevention 2014. World Health
44 365 Organization; 2014.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 358 11. World Health Organization. Health in 2015: from MDGs, millennium development goals to
359 SDGs, sustainable development goals. World Health Organization, 2015. World Health
360 Organization;
- 361 12. World Health Organization. Health in 2015: from MDGs, millennium development goals to
362 SDGs, sustainable development goals. World Health Organization, 2015. World Health
363 Organization; Available from:
364 https://www.who.int/violence_injury_prevention/violence/status_report/2014/en/
- 365 13. García-Moreno C, Pallitto C, Devries K, Stöckl H, Watts C, Abrahams N. Global and regional
366 estimates of violence against women: prevalence and health effects of intimate partner violence and
367 non-partner sexual violence. World Health Organization; 2013.
- 368 14. Ross CE, Mirowsky J. Neighborhood disadvantage, disorder, and health. *J Health Soc Behav.*
369 2001;42(3)258–276.
- 370 15. Lorenc T, Petticrew M, Whitehead M, Neary D, Clayton S, Wright K, et al. Fear of crime and
371 the environment: systematic review of UK qualitative evidence. *BMC Public Health.* 2013;13:496.
372 doi:10.1186/1471-2458-13-496
- 373 16. McEwen BS. Protective and Damaging Effects of Stress Mediators. Flier JS, Underhill LH,
374 editors. *N Engl J Med.* 1998;338:171–9. doi:10.1056/NEJM199801153380307
- 375 17. Zapata BC, Rebolledo A, Atalah E, Newman B, King MC. The influence of social and political
376 violence on the risk of pregnancy complications. *Am J Public Health.* 1992;82:685–90.
377 doi:10.2105/AJPH.82.5.685
- 378 18. Morenoff JD. Neighborhood Mechanisms and the Spatial Dynamics of Birth Weight. *Am J*
379 *Sociol.* 2003;108:976–1017. doi:10.1086/374405
- 380 19. Messer LC, Kaufman JS, Dole N, Herring A, Laraia BA. Violent crime exposure classification
381 and adverse birth outcomes: a geographically-defined cohort study. *Int J Health Geogr.* 2006;5:22.
382 doi:10.1186/1476-072X-5-22
- 383 20. Foureaux Koppensteiner M, Manacorda M. Violence and birth outcomes: Evidence from
384 homicides in Brazil. *J Dev Econ.* Elsevier B.V.; 2016;119:16–33.
385 doi:10.1016/j.jdeveco.2015.11.003
- 386 21. Matoba N, Reina M, Prachand N, Davis MM, Collins JW. Neighborhood Gun Violence and
387 Birth Outcomes in Chicago. *Matern Child Health J.* 2019;23:1251–9. doi:10.1007/s10995-019-
388 02765-w

- 389 22. Goin DE, M. Gomez A, Farkas K, Zimmerman SC, Matthay EC, Ahern J. Exposure to
390 Community Homicide During Pregnancy and Adverse Birth Outcomes. *Epidemiology*.
391 2019;30:713–22. doi:10.1097/EDE.0000000000001044
392 23. Mayne SL, Pool LR, Grobman WA, Kershaw KN. Associations of neighbourhood crime with
393 adverse pregnancy outcomes among women in Chicago: analysis of electronic health records from
394 2009 to 2013. *J Epidemiol Community Health*. 2018;72:230–6. doi:10.1136/jech-2017-209801
395 24. Felker-Kantor E, Wallace M, Theall K. Living in violence: Neighborhood domestic violence
396 and small for gestational age births. *Health Place*. 2017;46:130–6.
397 doi:10.1016/j.healthplace.2017.05.011
398 25. Messer LC, Kaufman JS, Dole N, Savitz DA, Laraia BA. Neighborhood Crime, Deprivation,
399 and Preterm Birth. *Ann Epidemiol*. 2006;16:455–62. doi:10.1016/j.annepidem.2005.08.006
400 26. Clemens T, Dibben C. Living in stressful neighbourhoods during pregnancy: an observational
401 study of crime rates and birth outcomes. *Eur J Public Health*. 2016;ckw131.
402 doi:10.1093/eurpub/ckw131
403 27. Brown R. The Mexican Drug War and Early-Life Health: The Impact of Violent Crime on Birth
404 Outcomes. *Demography*. 2018;55:319–40. doi:10.1007/s13524-017-0639-2
405 28. Urdinola-Contreras BP. War is not healthy. Political violence and infant health outcomes in
406 Colombia. *Rev Salud Pública*. 2018;20:326–33. doi:10.15446/rsap.v20n3.55430
407 29. Comacho A. Stress and Birth Weight: Evidence from Terrorist Attacks. *Am Econ Rev*.
408 2008;98:511–5. PMID: 29135213
409 30. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019).
410 World Urbanization Prospects: The 2018 Revision (ST/ESA/SER.A/420). New York: United
411 Nations.
412 31. Cardia, Nancy. *Urban Violence in São Paulo*. Washington, D.C.: Woodrow Wilson
413 International Center for Scholars (Comparative Urban Studies Occasional Papers Series, 33), 2000.
414 32. GINI index (World Bank estimate). Available from: data.worldbank.org/indicator/SI.POV.GINI
415 33. Cerqueira D, Bueno S, Lima RS de, Cristina N, Helder F, Paloma Palmieri A, et al. Atlas da
416 violência 2019. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea); 2019;
417 34. Rodrigues A, Hernandez R, Mariani D, Bergamo M. Mapa da morte em SP. 2017 [cited 2020
418 Feb 15]. Available from: <http://temas.folha.uol.com.br/mapa-da-morte/introducao/mapa-da-morte->

- 419 em-sp-vai-da-suecia-ate-o-mexico-locais-dos-crimes-se-repetem.shtml
- 420 35. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman BL, Lipp R. New Ballard Score,
2 expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr.* 1991;119:417–23. doi:10.1016/S0022-
421 3476(05)82056-6
4
422 3476(05)82056-6
6
- 423 36. Villar J, Ismail LC, Victora CG, Ohuma EO, Bertino E, Altman DG, et al. International
8 standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the
424 Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet.* 2014;384:857–68.
10
425 doi:10.1016/S0140-6736(14)60932-6
12
426 3476(05)82056-6
14
- 427 37. Kahle D, Wickham H. ggmap Spatial Visualization with ggplot2. *R J.* 2013;5:144–61. Available
16 from: <https://journal.r-project.org/archive/2013-1/kahle-wickham.pdf>
18
- 429 38. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing.* Vienna, Austria;
20 2019. Available from: <http://www.r-project.org/>
21
430 22
23
- 431 39. Vyas S, Kumaranayake L. Constructing socio-economic status indices: how to use principal
25 components analysis. *Health Policy Plan.* 2006;21:459–68. doi:10.1093/heapol/czl029
432 27
- 433 40. StataCorp. 2015. *Stata Statistical Software: Release 14.* College Station, TX: StataCorp LP.
28
434 29
30
- 435 41. Rubin DB. *Multiple imputation for nonresponse in surveys.* John Wiley & Sons; 2004.
32
- 436 42. Meng G, Thompson ME, Hall G. Pathways of neighbourhood-level socio-economic
34 determinants of adverse birth outcomes. *Int J Health Geogr.* 2013;12:32. doi:10.1186/1476-072X-
437 12-32
38
- 438 43. Wilson DK, Kliwer W, Sica DA. The relationship between exposure to violence and blood
39 pressure mechanisms. *Curr Hypertens Rep.* 2004;6:321–6. doi:10.1007/s11906-004-0028-2
41
439 42
43
- 440 44. Pynoos RS. Traumatic stress and developmental psychopathology in children and adolescents.
45 In: Oldham JM, Riba MB and Tasman A, editor. *American Psychiatric Press Review of Psychiatry.*
441 Vol. 12. Washington DC, American Psychiatric Association; 1993.
47
442 48
49
- 443 45. Wadhwa PD, Garite TJ, Porto M, Glynn L, Chicz-DeMet A, Dunkel-Schetter C, et al. Placental
51 corticotropin-releasing hormone (CRH), spontaneous preterm birth, and fetal growth restriction: A
444 prospective investigation. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191:1063–9. doi:10.1016/j.ajog.2004.06.070
53
445 54
55
- 446 46. Giurgescu C. Are Maternal Cortisol Levels Related to Preterm Birth? *J Obstet Gynecol*
57
447 *Neonatal Nurs.* 2009;38:377–90. doi:10.1111/j.1552-6909.2009.01034.x
59
- 448 47. Compas BE. *Psychobiological Processes of Stress and Coping: Implications for Resilience in*
61
62
63
64
65

- 449 Children and Adolescents--Comments on the Papers of Romeo & McEwen and Fisher et al.
450 Ann N Y Acad Sci. 2006;1094:226–34. doi:10.1196/annals.1376.024
- 451 48. McEwen BS. Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain.
452 Physiol Rev. 2007;87:873–904. doi:10.1152/physrev.00041.2006
- 453 49. Beijers R, Buitelaar JK, de Weerth C. Mechanisms underlying the effects of prenatal
454 psychosocial stress on child outcomes: beyond the HPA axis. Eur Child Adolesc Psychiatry.
455 2014;23:943–56. doi:10.1007/s00787-014-0566-3
- 456 50. Majzoub JA, Karalis KP. Placental corticotropin-releasing hormone: Function and regulation.
457 Am J Obstet Gynecol. 1999;180:S242–6. doi:10.1016/S0002-9378(99)70708-8
- 458 51. Mairesse J, Lesage J, Breton C, Bréant B, Hahn T, Darnaudéry M, et al. Maternal stress alters
459 endocrine function of the fetoplacental unit in rats. Am J Physiol Metab. 2007;292:E1526–33.
460 doi:10.1152/ajpendo.00574.2006
- 461 52. Jensen Peña C, Monk C, Champagne FA. Epigenetic effects of prenatal stress on 11 β -
462 hydroxysteroid dehydrogenase-2 in the placenta and fetal brain. PLoS One. 2012;7:e39791.
463 doi:10.1371/journal.pone.0039791
- 464 53. World Health Organization. Global report on urban health: equitable healthier cities for
465 sustainable development. World Health Organization; 2016; Available from:
466 <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204715>
- 467 54. Unicef. The state of the world's children 2012: children in an urban world. eSocialSciences;
468 2012.
- 469 55. Lima RS de, Bueno S, Martins C, Marques D, Pröglhöf PN, Astolfi R, et al. 9º Anuário
470 Brasileiro de Segurança Pública. 2015. Available from:
471 http://www.forumseguranca.org.br/storage/9_anuario_2015.retificado_.pdf
- 472 56. StataCorp. 2015. Stata 14 Base Reference Manual. College Station, TX: Stata Press.

478 **Tables**

479

2

3

480 **Table 1.** Frequency of violent crime type in pregnancy per exposure quintile.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

	1 st quintile	2 nd quintile	3 rd quintile	4 th quintile	5 th quintile
Murder	0.39 ± 0.49	1.71 ± 0.67	2.64 ± 0.71	4.34 ± 1.38	9.08 ± 2.85
Assault followed by death	0.26 ± 0.65	0.26 ± 0.65	0.29 ± 0.65	0.48 ± 0.90	0.65 ± 1.50
Bodily injury followed by death	0.01 ± 0.08	0.02 ± 0.12	0.01 ± 0.10	0	0
Death resulting from police intervention	0	0.01 ± 0.16	0.06 ± 0.34	0.22 ± 0.64	3.02 ± 2.79

507 **Table 2.** Birth outcomes and child and family characteristics by external violence exposure quintile.

	1 st quintile		3 rd quintile		5 th quintile		OR (95%CI)	p
	n	%	N	%	n	%		
Violent crimes quintile								
Number of occurrences								
SGA (N=5,080)								
Yes	116	6.7	36	7.9	87	9.5	1.06 (1.00-1.14)	0.062
PT (N=5,268)								
Yes	116	6.5	30	6.4	61	6.3	1.02 (0.95-1.09)	0.594
LBW (N=5,268)								
Yes	96	5.4	33	7.0	72	7.5	1.09 (1.02-1.17)	0.014
Fetal sex (N=5,268)								
Female	898	50.2	246	52.1	469	48.7	1.00 (0.96-1.03)	0.937
Maternal age (N=5,268)								
<20 years	381	21.3	93	19.7	239	24.8	1.03 (0.99-1.07)	0.157
20-35 years	1191	66.6	327	69.5	626	64.9		Ref.
> 35 years	216	12.1	52	11.0	99	10.3	0.96 (0.90-1.01)	0.125
Skin color (N=5,267)								
White	1080	60.4	286	60.7	593	61.5		Ref.
Non-white	707	39.6	186	39.4	371	38.5	1.00 (0.96-1.03)	0.888
SES status (N=2,709)								
Low	144	16.0	45	18.0	128	24.6	1.08 (1.00-1.16)	0.045
Lower-middle	225	25.1	66	27.9	156	30.0		Ref.
Middle	126	14.0	40	16.9	79	15.2	0.98 (0.91-1.06)	0.605
Upper-middle	213	23.7	91	20.3	104	20.0	0.91 (0.85-0.98)	0.013
High	190	21.2	79	16.0	53	10.2	0.83 (0.80-0.89)	<0.001
Education (N=3,256)								
Incomplete primary	154	13.2	44	15.8	109	18.9	1.07 (1.01-1.14)	0.026
Complete secondary	934	80.0	216	77.7	452	78.5		Ref.
Tertiary	79	6.8	18	6.5	15	2.6	0.83 (0.13-0.19)	<0.001
Diabetes (N=3,246)								
Yes	36	3.1	6	2.2	16	2.8	0.95 (0.83-1.09)	0.500
Hypertension (N=3,249)								
Yes	130	11.2	21	7.6	51	8.9	0.95 (0.88-1.03)	0.189
Smoke in pregnancy (N=3,240)								
Yes	161	14.0	37	13.3	83	14.4	0.99 (0.93-1.06)	0.802
Drink in pregnancy (N=3,245)								
Yes	161	13.9	40	14.4	66	11.4	0.94 (0.88-1.01)	0.079
Depression (N=3,251)								
Yes	34	2.9	3	1.1	9	1.6	0.93 (0.81-1.07)	0.329
Physical abuse (N=3,236)								
Yes	27	2.3	4	1.5	7	1.2	0.79 (0.66-0.95)	0.013

508 Quintiles categorized violent crimes within a 1-kilometer from participants' home address; OR: odds ratio; 95% CI: 95%
509 confidence interval; SGA: small for gestational age; PT preterm; LBW: low birth weight; SES: socioeconomic status.

51
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565

514 **Table 3.** Unadjusted and adjusted analyses between violent crimes exposure during
 515 pregnancy by quintiles, and birth outcomes.

		Unadjusted			Adjusted*		
		OR	95%IC	P	OR	95%IC	p
Small-for-gestational-age							
Violent crimes							
	1 st quintile	Ref.					
	2 nd quintile	1.36	1.02-1.83	0.039	1.34	1.00-1.80	0.054
	3 rd quintile	1.20	0.82-1.75	0.349	1.19	0.81-1.75	0.373
	4 th quintile	1.12	0.84-1.50	0.418	1.11	0.84-1.50	0.449
	5 th quintile	1.46	1.10-1.93	0.009	1.41	1.06-1.89	0.019
	Physical abuse				1.07	0.43-2.65	0.896
	Depression				0.42	0.13-1.36	0.147
	Diabetes				0.70	0.27-1.82	0.468
	Hypertension				1.27	0.82-1.95	0.286
	Smoke				1.83	1.32-2.55	<0.001
	Drink				1.43	0.99-2.05	0.055
Preterm birth							
Violent crimes							
	1 st quintile	Ref.					
	2 nd quintile	1.17	0.86-1.59	0.327	1.16	0.84-1.59	0.367
	3 rd quintile	0.98	0.65-1.48	0.918	1.01	0.66-1.54	0.958
	4 th quintile	1.29	0.98-1.72	0.070	1.35	1.01-1.80	0.040
	5 th quintile	0.97	0.71-1.34	0.870	1.01	0.72-1.40	0.969
	Physical abuse				1.62	0.77-3.44	0.206
	Depression				0.81	0.32-2.08	0.662
	Diabetes				0.94	0.39-2.23	0.884
	Hypertension				1.21	0.76-1.91	0.425
	Smoke				2.04	1.47-2.82	< 0.001
	Drink				1.18	0.79-1.76	0.420
Low birth weight							
Violent crimes							
	1 st quintile	Ref.					
	2 nd quintile	1.38	1.00-1.91	0.050	1.37	0.98-1.91	0.063
	3 rd quintile	1.32	0.88-1.99	0.178	1.36	0.89-2.07	0.153
	4 th quintile	1.48	1.10-1.99	0.010	1.50	1.11-2.05	0.009
	5 th quintile	1.42	1.04-1.95	0.029	1.42	1.03-1.98	0.034
	Physical abuse				2.12	1.03-4.36	0.042
	Depression				0.71	0.22-2.25	0.557
	Diabetes				0.30	0.07-1.30	0.107
	Hypertension				1.73	1.10-2.71	0.017
	Smoke				2.89	2.07-4.03	< 0.001
	Drink				1.14	0.77-1.69	0.522

516 OR: odds ratio; 95% CI: 95% confidence interval; All analyses used multiple imputations. Imputed data were averaged across the 50
 517 imputed data sets using Rubin's rule [41]. *Adjusted for maternal age, child sex (female), education, and socioeconomic status.

521 **Figures Legend**

1
522

3

4

523 **Figure 1.** Heatmap of the Butantã-Jaguapé Region of São Paulo showing the distribution of violent
6
724 crimes during pregnancy. Blue indicates lower number of violent crimes incidents and red higher.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

The point layers show the geographic distribution of ROC residences (a), infants born small for gestational age (b), preterm births (c), and low birth weight (d).

Figure 2. Exposure to violent crime and average birth outcomes. The figure shows log polynomial smoothed relationship between violent crime exposure and preterm birth (a), low birth weight (b), and small-for-gestational-age (c).

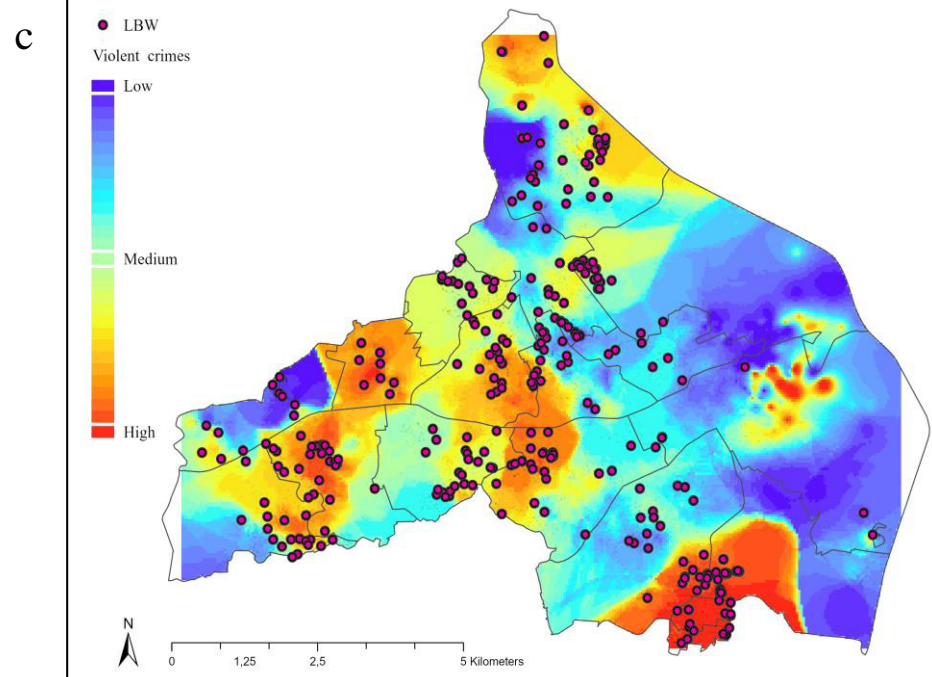
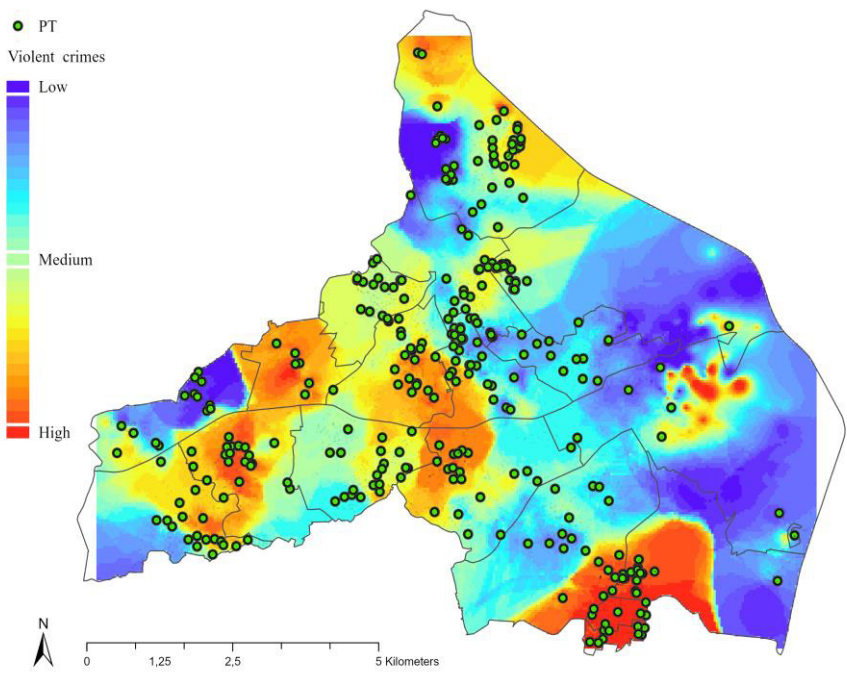
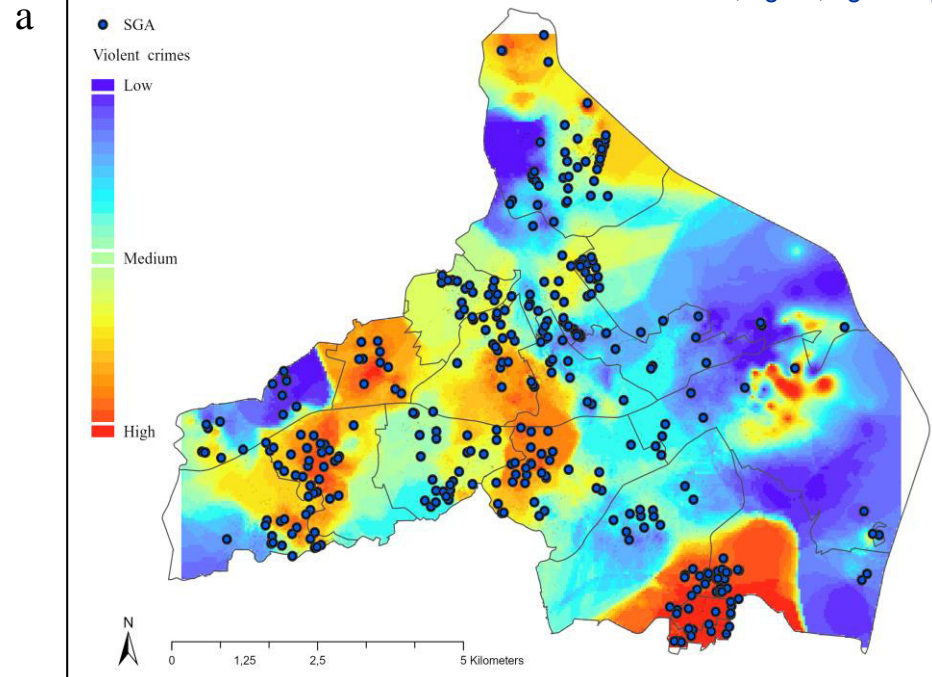
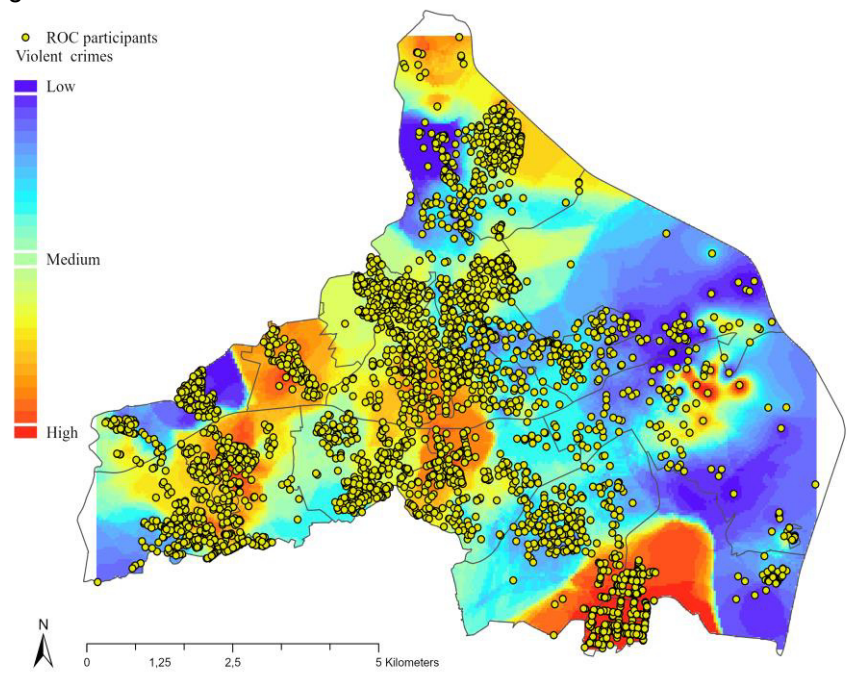
532 **Supplementary Material**

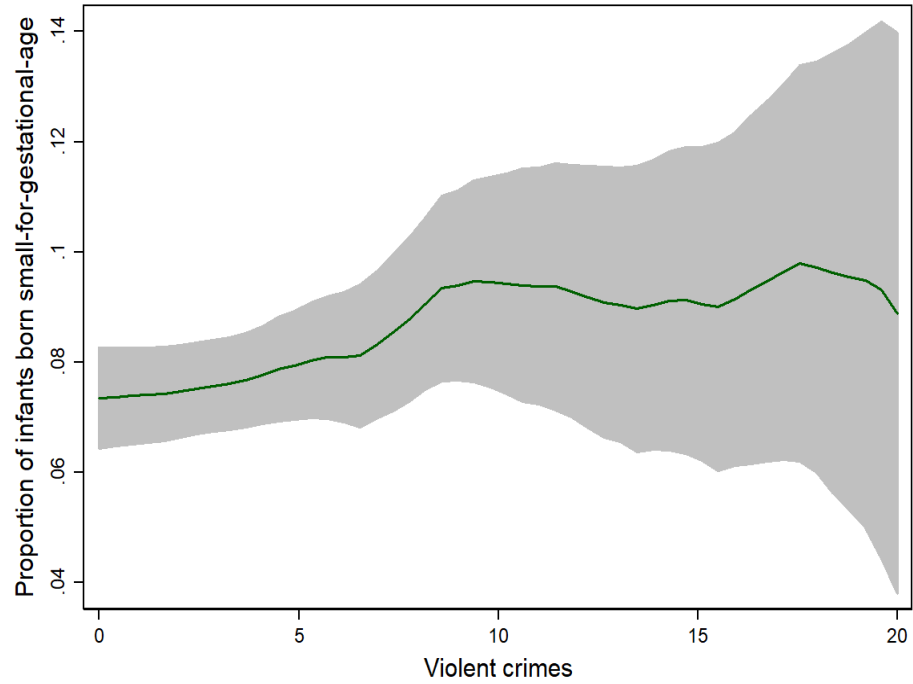
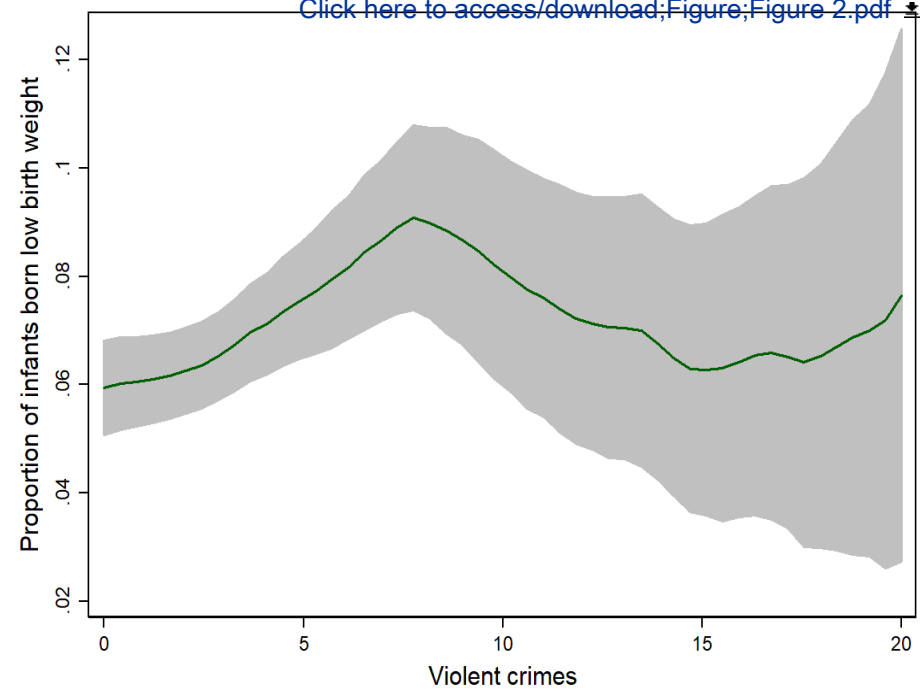
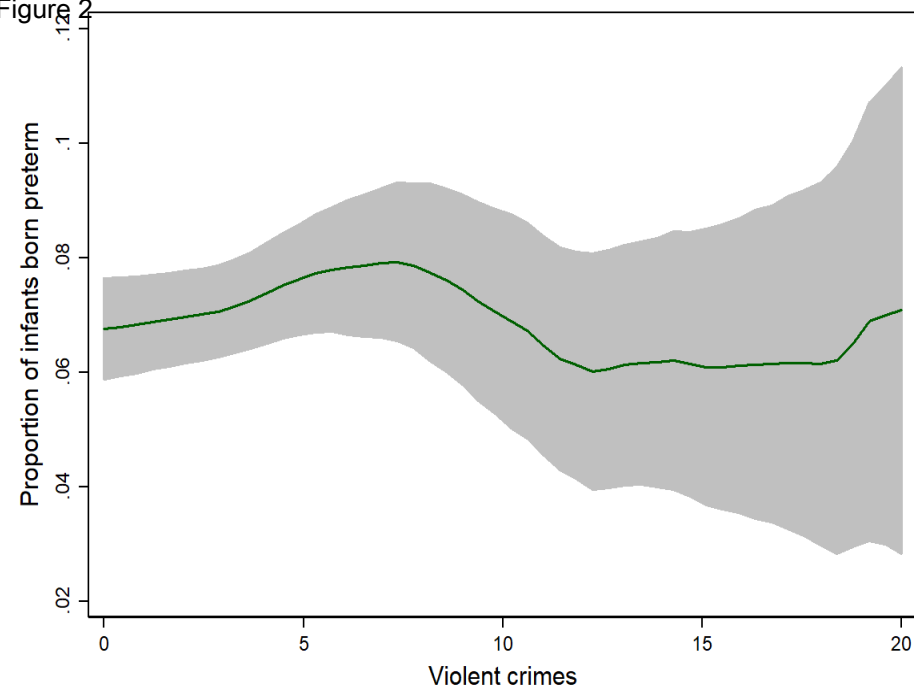
534 **Supplementary file 1:** Postpartum questionnaire.

536 **Supplementary file 2:** Multiple imputations

537 **Table S1.** Missingness among variables used in the multiple imputation models.

Figure 1









Click here to access/download
Supplementary Material
Supplementary file 2.docx