

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia



Tese de Doutorado

**Amamentação, padrões alimentares e massa mineral óssea de adolescentes pertencentes à Coorte de Nascimentos de Pelotas de 1993**

Ludmila Correa Muniz

Pelotas, 2015

**LUDMILA CORREA MUNIZ**

**Amamentação, padrões alimentares e massa mineral óssea de adolescentes  
pertencentes à Coorte de Nascimentos de Pelotas de 1993**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia junto a Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Epidemiologia.

Orientadora: Ana Maria Baptista Menezes

Co-orientadora: Maria Cecília Formoso Assunção

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

M963a Muniz, Ludmila Correa

Amamentação, padrões alimentares e massa mineral óssea de adolescentes pertencentes à coorte de nascimentos de Pelotas de 1993 / Ludmila Correa Muniz ; Ana Maria Baptista Menezes, orientadora ; Maria Cecilia Formoso Assunção, coorientadora. — Pelotas, 2015.

212 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Epidemiologia. 2. Aleitamento materno. 3. Composição corporal. 4. Massa mineral óssea. 5. Adolescentes.  
I. Menezes, Ana Maria Baptista, orient. II. Assunção, Maria Cecília Formoso, coorient. III. Título.

CDD : 614.4

**LUDMILA CORREA MUNIZ**

**Amamentação, padrões alimentares e massa mineral óssea de adolescentes  
pertencentes à Coorte de Nascimentos de Pelotas de 1993**

**Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em  
Epidemiologia, Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Faculdade de  
Medicina, Universidade Federal de Pelotas.**

**Data da defesa:** 20 de março de 2015

**Banca Examinadora:**

Prof. Dra. Maria Cristina Gonzalez  
Universidade Católica de Pelotas  
*Revisor externo*

Prof. Dra. Denise Petrucci Gigante  
Universidade Federal de Pelotas  
*Revisor interno*

Prof. Dr. Alúcio Jardim Dornellas de Barros  
Universidade Federal de Pelotas  
*Revisor interno*

Prof. Dra. Ana Maria Baptista Menezes  
Universidade Federal de Pelotas  
*Orientadora*

## **Agradecimentos**

Considero esta a parte mais difícil da tese a ser escrita, talvez pela dificuldade de colocar em poucas palavras toda a gratidão que tenho àqueles que me acompanharam ao longo desses quatro anos. Quatro anos esses, os quais eu julgo os mais intensos, estressantes e felizes da minha vida, pois apesar de toda a “pressão” foi o período em que obtive as conquistas mais importantes da minha trajetória... além de ser aprovada no doutorado, eu casei, construí minha casa e passei em primeiro lugar no concurso para professor assistente da faculdade de nutrição da UFPel, onde trabalharei pelos próximos 25 anos... para ser completo, só faltou aumentar a família.

E é em função de tudo isso que primeiramente eu agradeço a Deus. Agradeço a Ele por ter me presenteado com tanta coisa boa, além de me dar forças para seguir em frente com meus objetivos e não desanimar frente às dificuldades.

Em segundo lugar, agradeço ao Pepe. Meu marido, amigo, companheiro... e faltam atributos para descrever essa pessoa maravilhosa que cruzou a minha vida. Foi ele que me ergueu nos momentos em que quase desabei e pensei em desistir de tudo. Foi ele que, em um dos momentos mais importantes, esteve todo o tempo junto comigo me incentivando e me fazendo acreditar que tudo daria certo. Nunca vou esquecer a noite anterior à prova didática do concurso... as quatro horas da manhã eu ainda não tinha minha aula pronta e, em meio a muito pânico e choro, ele me acalmou, me fazendo companhia e massagem nos pés para eu relaxar. Como em um passo de mágica, eu consegui concluir a aula e às oito horas do dia seguinte eu estava lá, exausta, mas confiante que daria certo. E deu! Meu amor, muito obrigada por tudo!

Agradeço também a minha família. Mãe, Raquel e Ney, obrigada por compreenderem a minha ausência e por sempre acreditarem em mim.

Não posso deixar de agradecer a ela, minha irmã do coração, Samanta. Sempre do meu lado, mesmo que distante fisicamente. Sempre me falando a palavra certa na hora certa. Sempre me compreendendo e me ajudando, até mesmo nas horas que eu não estava com a razão. Tenho muito orgulho de te ter como minha amiga. És um exemplo

de ser humano. Já te disse isso mil vezes: “quando eu crescer quero ser igual a ti”. Verdadeira amizade para o resto da vida. Obrigada, Sá!

Agradeço, também, a minha comadre Sil pela amizade e companheirismo de sempre.

Aos meus ex-colegas de doutorado e amigos, Fernando e Jeovany... muito obrigada pela ajuda incondicional de vocês. Sem ela, esse trabalho não seria possível. Serei eternamente grata e estarei sempre em dívida com vocês. Valeu por tudo guris!

Cecil, minha colega, amiga e querida co-orientadora... obrigada pela compreensão, parceria e ensinamentos de sempre. Mais um exemplo a ser seguido.

E o que falar dela, minha orientadora, a Aninha! Sempre chiquérrima... símbolo de uma mulher bem sucedida, inspiração para muitos iniciantes no meio acadêmico, como eu. Apesar de em muitos momentos termos batido de frente, quero dizer que tivestes um papel fundamental na minha formação. Tenho plena convicção de que se cheguei aonde cheguei foi graças a ti. Mesmo com os percalços no meio do caminho, tu sempre acreditaste em mim. Fostes uma baita orientadora. Tenho muito respeito e admiração por ti. Serei eternamente grata por tudo que representastes na minha vida. Obrigada, do fundo do meu coração, por tudo!

Aos meus colegas de trabalho, colegas de doutorado, professores e funcionários do programa, o meu muito obrigada sempre.

## Apresentação

Esta tese é fruto de trabalho de pesquisa inserido na Coorte de Nascimentos de 1993 de Pelotas, RS e é requisito para a conclusão do curso de Doutorado em Epidemiologia de Ludmila Correa Muniz, que teve como orientadora a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Baptista Menezes, do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal de Pelotas. Este volume é composto de quatro partes: 1) projeto de pesquisa; 2) relatório do trabalho de campo; 3) artigos e 4) matéria para a imprensa. Em decisão aprovada pelo Colegiado de Curso, um dos artigos inicialmente previstos no projeto de pesquisa que deu origem a esta tese foi substituído. Sendo assim, os artigos que serão apresentados estão descritos a seguir:

**Artigo de revisão:** Título: *Effect of breastfeeding on bone mass from childhood to adulthood: a systematic review of the literature*. O objetivo desta revisão de literatura foi investigar a relação entre amamentação e massa óssea durante a infância, adolescência e/ou idade adulta. Este artigo foi submetido à revista *International Breastfeeding Journal*.

**Artigo original 1:** Título: *Breastfeeding and bone mass at the ages of 18 and 30: prospective analysis of the live births from the Pelotas (Brazil) 1982 and 1993 cohorts*. Escrito com o objetivo de avaliar o efeito do aleitamento materno, duração total do aleitamento materno e padrão de amamentação aos três meses de vida sobre a massa óssea aos 18 e 30 anos de idade. Para tanto, foram utilizados dados da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 1982 e de uma subamostra da Coorte de Nascimentos de 1993. Este artigo foi aceito para publicação pela revista *PLOS ONE*.

**Artigo original 2:** Título: *Body mass index at 11 years and bone mass at age 18: path analysis within the 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study*. Este artigo teve como objetivo avaliar a associação do índice de massa corporal (IMC) aos 11 anos de idade com a massa óssea de participantes da coorte de nascimentos de 1993, aos 18 anos, bem como avaliar o potencial papel do IMC, massa gorda (MG) e massa livre de gordura (MLG) aos 18 anos de idade como mediadores desta associação, através de “path analysis”. Este artigo foi aceito para publicação pela revista *BMC Musculoskeletal Disorders*.

## Sumário da Tese

I. Projeto de Pesquisa.....	07
1. Modificações do Projeto.....	100
II. Relatório de Trabalho de Campo.....	103
III. Artigos.....	127
1. Artigo de revisão.....	128
2. Artigo original 1.....	147
3. Artigo original 2.....	177
IV. Divulgação dos resultados para imprensa.....	211

## **I. Projeto de pesquisa**

---

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
DOUTORADO EM EPIDEMIOLOGIA

**AMAMENTAÇÃO, PADRÕES ALIMENTARES E MASSA  
MINERAL ÓSSEA DE ADOLESCENTES PERTENCENTES À  
COORTE DE NASCIMENTOS DE PELOTAS DE 1993**

Projeto de Pesquisa

**Doutoranda:** Ludmila Correa Muniz

**Orientadora:** Ana Maria Baptista Menezes

**Co-orientadora:** Maria Cecília Formoso Assunção

**Pelotas, RS**

**2012**

## Sumário

RESUMO.....	xi
TÍTULO DOS ARTIGOS DA TESE .....	xii
DEFINIÇÃO DE TERMOS E ABREVIATURAS .....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Composição corporal .....	15
1.2 O osso como um componente da composição corporal.....	17
1.2.1 Esqueleto: conceito, funções e divisão.....	17
1.2.2 Tecido ósseo: histologia e anatomia.....	18
1.2.3 Papel metabólico do tecido ósseo.....	19
1.2.4 Formação e crescimento ósseo .....	20
1.2.5 Pico de massa óssea.....	22
1.2.6 Métodos para medir a massa óssea .....	23
1.3 Fatores associados à constituição da massa mineral óssea .....	25
1.3.1 Efeito de características sociodemográficas sobre o CMO e/ou DMO.....	25
1.3.2 Efeito de exposições precoces sobre o CMO e/ou DMO .....	26
1.3.3 Efeito de exposições comportamentais contemporâneas sobre o CMO e/ou DMO .....	28
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	32
2.1 Amamentação e massa mineral óssea .....	35
2.1.1 Artigos incluídos na revisão .....	35
2.1.2 Efeito da amamentação sobre a massa mineral óssea .....	36
2.2 Padrões alimentares e massa mineral óssea .....	42
2.2.1 Artigos incluídos na revisão .....	42
2.2.2 Associação entre padrões alimentares e massa mineral óssea .....	44
3. JUSTIFICATIVA .....	52
4. MODELO TEÓRICO.....	53
5. OBJETIVOS .....	54
5.1 Objetivo geral.....	54
5.2 Objetivos específicos .....	54
6. HIPÓTESES .....	54
7. METODOLOGIA.....	55
7.1 Delineamento .....	55
7.2 População em estudo.....	56

7.3 Critérios de inclusão .....	57
7.4 Critérios de exclusão.....	57
7.5 Tamanho da amostra e poder .....	58
7.6 Instrumentos.....	59
7.6.1 Instrumento para coleta do desfecho.....	60
7.6.2 Instrumentos para coleta das exposições principais .....	62
7.7 Principais variáveis .....	64
7.7.1 Variáveis dependentes.....	64
7.7.2 Variáveis independentes.....	64
7.7.3 Potenciais mediadores e/ou fatores de confusão .....	66
7.8 Seleção e treinamento dos entrevistadores .....	68
7.9 Logística e coleta dos dados .....	68
7.10 Estudo piloto .....	69
8. SUPERVISÃO E CONTROLE DE QUALIDADE.....	69
9. PROCESSAMENTO DOS DADOS .....	70
10. ANÁLISE DOS DADOS .....	70
10.1 Modelo de análise .....	71
11. ASPECTOS ÉTICOS .....	74
12. CRONOGRAMA .....	74
13. DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS.....	75
15. ORÇAMENTO/FINANCIAMENTO .....	75
16. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75
17. ANEXOS .....	87
17.1 Anexo 1: Questões sobre Amamentação (acompanhamento dos seis e 12 meses) .....	87
17.2 Anexo 2: Questionário de frequência alimentar (acompanhamento 15 anos) .....	92
17.3 Anexo 3: Questionário de frequência alimentar (acompanhamento 18 anos) .....	95

## RESUMO

O crescimento/desenvolvimento e manutenção do esqueleto humano requerem um adequado suprimento de distintos fatores nutricionais ao longo do ciclo vital. O efeito da dieta no primeiro ano de vida, sobretudo da amamentação, tem sido objeto de poucos estudos e os resultados são contraditórios. A associação entre padrões alimentares e medidas de massa óssea também tem sido pouco explorada. A literatura acerca dos efeitos destas exposições sobre a massa mineral óssea de adolescentes é escassa. O presente estudo pretende avaliar a relação entre amamentação e padrões alimentares ao longo da adolescência (dos 15 aos 18 anos) com medidas de massa mineral óssea aos 18 anos de idade. As medidas de massa óssea (conteúdo e densidade mineral óssea do corpo inteiro, coluna lombar e colo do fêmur) serão avaliadas através de um equipamento de absorciometria de dupla energia de raios X (DXA). O estudo terá delineamento longitudinal e a população em estudo compreenderá os adolescentes pertencentes à coorte de nascimentos de Pelotas de 1993, que foram acompanhados durante o primeiro ano de vida e aos 15 e 18 anos de idade. O presente projeto faz parte de um projeto maior, intitulado *“Influências precoces e contemporâneas sobre a composição corporal, capital humano, saúde mental e precursores de doenças crônicas complexas: Coorte de Nascidos vivos de 1993”*, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

## **TÍTULO DOS ARTIGOS DA TESE**

1. Avaliação do efeito da amamentação sobre a massa mineral óssea da infância até a idade adulta: revisão sistemática da literatura

2. Influência da amamentação sobre a massa mineral óssea de adolescentes com 18 anos de idade pertencentes a uma coorte de nascimentos

3. Trajetória de padrões alimentares durante a adolescência e massa mineral óssea aos 18 anos de idade: uma análise da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 1993

## DEFINIÇÃO DE TERMOS E ABREVIATURAS

AM	Aleitamento materno
AME	Aleitamento materno exclusivo
AMP	Aleitamento materno predominante
ACP	Análise de componentes principais
AFC	Análise de fator comum
FLV	Frutas, legumes e verduras
CMO	Conteúdo mineral ósseo (g)
DMO	Densidade mineral óssea ( $\text{g}/\text{cm}^2$ )
DP	Desvio padrão
DXA	Absorciometria de dupla energia de raios X
Lilacs	Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
PDA	Personal digital assistant
PPGE	Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia
PTH	Paratormônio
QFA	Questionário de frequência alimentar
SXA	Absorciometria de raios X de energia única
TCQ	Tomografia computadorizada quantitativa
UFPel	Universidade Federal de Pelotas
WoS	Web of Science

## 1. INTRODUÇÃO

A literatura sobre o conteúdo e/ou densidade mineral óssea em amostras de base populacional e entre indivíduos jovens é escassa. Tal fato pode ser consequência da baixa prevalência de doenças osteodegenerativas na infância, adolescência e início da idade adulta. Entretanto, a avaliação das medidas de massa óssea em idades mais jovens é necessária, tendo em vista que a prevenção de perdas ósseas contribui para a redução da incidência de osteoporose e subsequentes fraturas em idades mais avançadas.

O conteúdo e a densidade mineral óssea, bem como a osteoporose, podem ser determinados por fatores genéticos e ambientais, dos quais se destaca a alimentação, exposição de interesse nesse estudo. O efeito da dieta no primeiro ano de vida, sobretudo da amamentação, tem sido objeto de poucos estudos, grande parte conduzida em países de alta renda e cujos resultados são controversos. Quanto aos efeitos da alimentação habitual sobre as medidas de massa óssea, o foco dos estudos tem sido o consumo de nutrientes e/ou grupos de alimentos específicos, sendo os padrões alimentares pouco explorados.

Frente a isso, o presente projeto se propõe a avaliar o papel da amamentação e dos padrões alimentares durante a adolescência sobre a massa mineral óssea de jovens com 18 anos de idade, acompanhados desde o nascimento e pertencentes à coorte de nascimentos de Pelotas de 1993.

Para contextualizar o problema de pesquisa, ainda na introdução serão abordados aspectos sobre composição corporal, anatomia, histologia e papel metabólico dos ossos, crescimento ósseo e pico de massa óssea, além de métodos para avaliar a massa óssea e fatores associados à constituição da massa mineral óssea – precoces e contemporâneos. Na

sequência, a revisão de literatura focará sobre os efeitos da amamentação e dos padrões alimentares, sobre medidas de massa óssea.

## 1.1 Composição corporal

A composição de um organismo reflete o acúmulo, ao longo da vida, de nutrientes e outros substratos adquiridos do meio ambiente e retidos pelo corpo. Composição corporal pode ser definida como a expressão do peso corporal em dois ou mais compartimentos baseados em modelos anatômicos (pele, músculo, ossos e órgãos) ou químicos (água, mineral ósseo, mineral extra-ósseo, proteína, gordura e glicogênio), obtidos a partir de análises de dissecação de cadáveres (Heymsfield, Wang et al. 1997).

O estudo da composição corporal segue modelo proposto por Wang, Pierson e Heymsfield (1992), no qual a mesma é representada em cinco níveis com componentes distintos, que somados correspondem à massa corporal. Os cinco níveis são: atômico, molecular, celular, tecido-sistemas (ou funcional) e corpo inteiro (Figura 1) (Heymsfield, Wang et al. 1997; Ellis 2000).

O nível atômico inclui elementos como oxigênio, carbono, hidrogênio, nitrogênio, cálcio e potássio, compondo mais de 98% da massa corporal (Heymsfield, Wang et al 1997). No nível molecular (segundo nível), há quatro componentes principais: água, lipídios, proteínas e minerais (ósseos e de tecidos moles), a partir dos quais podem ser criados vários modelos que permitem incluir de dois a seis compartimentos (Heymsfield, Wang et al. 1997; Ellis 2000).

O nível celular representa as células e os fluidos e sólidos extracelulares, tendo grande importância para o entendimento dos processos fisiopatológicos das doenças. No nível funcional, os componentes do nível celular são organizados em tecidos, órgãos e sistemas. Nesse nível, a massa corporal é resultante do somatório do tecido muscular, conectivo (adiposo e ósseo), epitelial e nervoso. O quinto e último nível representa o corpo inteiro e diz respeito ao formato, à dimensão e às características físicas que podem ser descritas tendo em vista as dimensões corporais (Heymsfield, Wang et al. 1997; Ellis 2000).

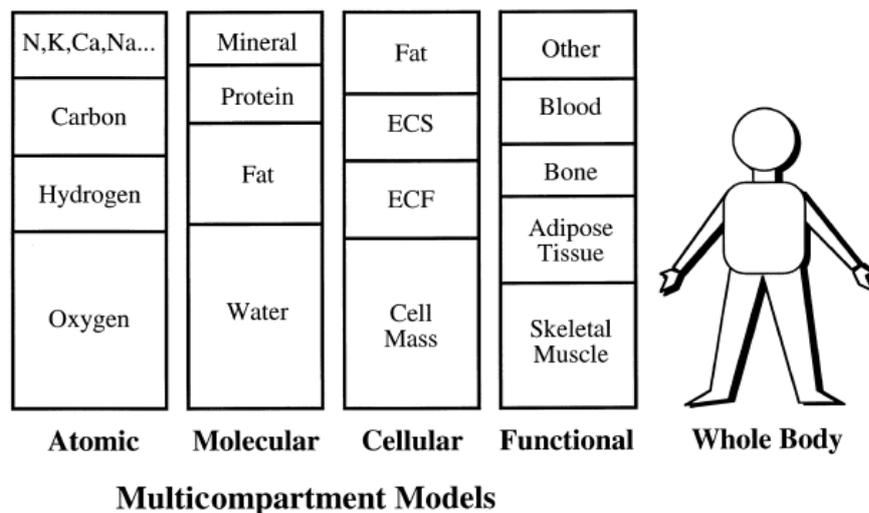


Figura 1. Modelo multicompartimental de cinco níveis de composição corporal. ECS: sólidos extracelulares; ECF: fluidos extracelulares. (Fonte: Ellis, 2000 – modificado de Wang e col.)

A seguir a abordagem se dará em relação ao tecido ósseo, componente corporal objeto deste estudo.

## 1.2 O osso como um componente da composição corporal

Em épocas passadas, um dos maiores obstáculos para estimar a composição corporal era a falta de um método *in vivo* para quantificar o tecido ósseo que, juntamente com músculos e gordura, é responsável por variações na composição do corpo. Os primeiros estudos basearam-se na análise do esqueleto completo, ossos isolados e radiografias, indicando existência de variabilidade na mineralização e na massa óssea segundo algumas características. As novas tecnologias disponíveis, em especial, a absorciometria de dupla energia de raios X (DXA), permitiram fazer novas inferências sobre o osso como um componente da composição corporal e sobre o conteúdo mineral ósseo (Heymsfield, Wang et al. 1997).

Características relacionadas especificamente com a estrutura corporal óssea são apresentadas a seguir.

### 1.2.1 Esqueleto: conceito, funções e divisão

A julgar pelo emprego rotineiro do termo, esqueleto poderia significar a simples reunião dos ossos. Entretanto, entende-se por esqueleto o conjunto de ossos e cartilagens que se ligam para formar o arcabouço do corpo do animal e desempenhar várias funções (Dangelo and Fattini 2002).

Dentre as funções do esqueleto podemos apontar: proteção (para órgãos como o coração, pulmões e sistema nervoso central); sustentação e conformação do corpo; local de armazenamento de íons como cálcio e fósforo; deslocamento do corpo e produção de células sanguíneas (Dangelo and Fattini 2002).

O esqueleto pode ser dividido em duas grandes porções: uma axial e outra apendicular. O esqueleto axial consiste na porção mediana, formando o eixo do corpo, e é composto pelos ossos da cabeça, pescoço e tronco (tórax e abdome). O esqueleto apendicular, por sua vez, compreende os membros superiores e inferiores. Ambas as porções são unidas por meio de cinturas: escapular (também denominada torácica, constituída pela escápula e clavícula) e pélvica (constituída pelos ossos do quadril). No adulto, idade na qual se considera completo o desenvolvimento orgânico, o esqueleto é composto por 206 ossos (Dangelo and Fattini 2002).

### 1.2.2 Tecido ósseo: histologia e anatomia

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea (Junqueira and Carneiro 2004). A matriz óssea é formada por uma porção mineral ou inorgânica e outra orgânica, sendo esta última composta por fibras colágenas (95% de colágeno tipo I) e por pequena quantidade de proteoglicanos e glicoproteínas (que participam da mineralização da matriz) (Junqueira and Carneiro 2004; Fauci, Braunwald et al. 1998). A parte mineral ou inorgânica corresponde à, aproximadamente, metade do peso da matriz óssea. É composta por cálcio e fósforo que formam cristais semelhantes à estrutura da hidroxiapatita:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (Junqueira and Carneiro 2004). A combinação entre a hidroxiapatita e as fibras colágenas confere dureza e resistência ao tecido ósseo.

Além do material extracelular, o tecido ósseo é formado por três tipos de células: os osteócitos, que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; os osteoblastos, que sintetizam a parte orgânica da matriz e localizam-se na sua superfície; e os osteoclastos, que

são células gigantes, móveis e multinucleadas as quais estão envolvidas nos processos de remodelação dos ossos (Junqueira and Carneiro 2004).

Anatomicamente, o tecido ósseo é constituído microscopicamente pela substância óssea compacta e pela esponjosa (Dangelo and Fattini 2002). Na substância óssea compacta, as lamínulas de tecido ósseo encontram-se fortemente unidas umas às outras, sem que haja espaço livre entre elas. Consequentemente, este tipo é mais denso e rijo. Na substância esponjosa, as lamínulas se arranjam de forma a deixar espaços entre si ou lacunas que se comunicam umas com as outras (Dangelo and Fattini 2002).

### 1.2.3 Papel metabólico do tecido ósseo

O esqueleto contém mais de 99% do cálcio presente no corpo humano adulto, funcionando como um reservatório desse íon, cuja concentração no sangue (calcemia) deve ser mantida constante para o funcionamento normal do organismo (Junqueira and Carneiro 2004; Fauci, Braunwald et al. 1998). Há um contínuo intercâmbio entre o cálcio do plasma sanguíneo e o dos ossos. O cálcio absorvido da alimentação e que faria aumentar a concentração sanguínea deste íon é rapidamente depositado no tecido ósseo, e, contrariamente, o cálcio dos ossos é mobilizado quando diminui sua concentração no sangue (Fauci, Braunwald et al. 1998).

Existem dois mecanismos responsáveis pela mobilização do cálcio depositado nos ossos. O primeiro consiste na simples transferência de íons dos cristais de hidroxiapatita para o líquido intersticial, do qual o cálcio passa para o sangue. O segundo mecanismo de

mobilização do cálcio é de ação mais lenta e decorre da ação de hormônios – paratormônio, calcitonina e 1,25-diidroxitamina D – sobre o tecido ósseo (Fauci, Braunwald et al. 1998).

O paratormônio (PTH), hormônio da paratireoide, é responsável pelo aumento da calcemia (Fauci, Braunwald et al. 1998). Para tanto, toda vez que os receptores de íons cálcio, presentes na paratireoide, detectam uma baixa concentração sérica de cálcio ionizado, a secreção de PTH é estimulada (Fauci, Braunwald et al. 1998). Assim, este hormônio atua sobre os ossos para liberar cálcio e nos rins para diminuir a excreção urinária do íon e aumentar a produção de 1,25-diidroxitamina D (Fauci, Braunwald et al. 1998).

A 1,25-diidroxitamina D [1,25(OH)<sub>2</sub>D], um metabólito da vitamina D, aumenta a absorção de cálcio no intestino e age sobre os ossos para liberação adicional de cálcio. Entretanto, aumentos de cálcio ionizado no soro são revertidos por *feedback* negativo da 1,25(OH)<sub>2</sub>D sobre a secreção de PTH, mecanismo este ainda não totalmente compreendido (Fauci, Braunwald et al. 1998).

Outro hormônio, a calcitonina, produzida pelas células parafoliculares da tireoide, inibe a reabsorção da matriz e, portanto, a mobilização de cálcio do osso, tendo ação antagônica a do PTH (Fauci, Braunwald et al. 1998).

#### 1.2.4 Formação e crescimento ósseo

No embrião e na criança em crescimento, o osso é formado ou por um processo de ossificação intramembranosa, que se dá no interior de uma membrana conjuntiva, ou por ossificação endocondral, que ocorre através de remodelagem e substituição da cartilagem previamente calcificada (Junqueira and Carneiro 2004; Fauci, Braunwald et al. 1998).

Em ambos os processos, primeiramente é formado tecido ósseo primário ou reticular, constituído por feixes de fibras colágenas entrelaçadas e dispostas aleatoriamente, o qual aos poucos é substituído por tecido secundário ou lamelar. Este último é organizado em feixes de fibras colágenas distribuídas regularmente em lâminas paralelas ou concêntricas (Junqueira and Carneiro 2004; Fauci, Braunwald et al. 1998).

O crescimento dos ossos em comprimento depende da proliferação das células da cartilagem e da sequência endocondral no nível da placa de crescimento. Já, o crescimento em largura e espessura ocorre pela formação de osso na superfície periosteal (externa) e pela reabsorção na superfície endosteal (interna), sendo a taxa de formação maior que a de reabsorção (Fauci, Braunwald et al. 1998).

No final da puberdade e/ou início da idade adulta, o crescimento ósseo em comprimento e a formação de osso endocondral cessam, após o fechamento das placas de crescimento. Entretanto, o crescimento ósseo intramembranoso persiste ao longo da vida, embora de forma mais lenta (Fauci, Braunwald et al. 1998).

A velocidade de crescimento do esqueleto como um todo é alta logo após o nascimento, diminuindo até o final do primeiro ano de vida, voltando a aumentar no final da infância (Cooper, Westlake et al. 2006). Neste estágio, o crescimento ósseo longitudinal é mais rápido no esqueleto apendicular (braços e pernas) do que no axial (tronco), assim permanecendo até a puberdade. Com a secreção dos hormônios sexuais na puberdade, o crescimento dos ossos axiais acelera, enquanto que o dos ossos longos diminui até as epífises se fecharem e o crescimento linear cessa (Cooper, Westlake et al. 2006).

### 1.2.5 Pico de massa óssea

O pico de massa óssea pode ser definido como a quantidade máxima de massa óssea que um indivíduo acumula desde o nascimento até a maturidade do esqueleto (Schonau 2004; Heaney, Abrams et al. 2000). Entretanto, a idade exata em que o pico é atingido é desconhecida, variando conforme região do esqueleto e método de avaliação da massa óssea (Heaney, Abrams et al. 2000).

De acordo com alguns autores, o pico de massa óssea ocorre entre 18 e 30 anos de idade (Heaney, Abrams et al. 2000; Mora and Gilsanz 2003; Recker, Davies et al. 1992), diferindo para densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO). Acredita-se que o pico de DMO ocorra por volta dos 22 anos, ao passo que o do CMO se dá em média aos 26 anos de idade (Teegarden, Proulx et al. 1995).

Quanto à região do esqueleto avaliada, alguns estudos têm mostrado que no colo do fêmur o pico de massa óssea ocorre antes do 20 anos de idade (Heaney, Abrams et al. 2000; Armstrong, Shakir et al. 2000; Baroncelli and Saggese 2000), sendo que a massa óssea do esqueleto como um todo seria atingida de 6 a 10 anos mais tarde (Heaney, Abrams et al. 2000). Os ossos do crânio, por sua vez, nunca atingem um pico aumentando em massa ao longo da vida. Outros ossos, a exemplo das vértebras, continuam a aumentar em diâmetro (Heaney, Abrams et al. 2000).

A redução da massa óssea inicia-se ainda na idade adulta jovem, logo após o seu pico de formação ser atingido. Logo, favorecer o máximo acúmulo de massa óssea durante o período de formação do osso diminuirá o risco de fraturas e incidência de osteoporose no futuro.

Para tanto, é importante conhecer os métodos utilizados para medir a massa óssea, bem como, os fatores que interferem no processo de formação do osso. Tais aspectos serão abordados nos tópicos a seguir.

#### 1.2.6 Métodos para medir a massa óssea

Atualmente, estão disponíveis várias técnicas não invasivas para estimar o CMO e a DMO (Ellis 2000). Estas técnicas incluem densitometria óssea por meio de absorciometria de dupla energia de raios X (DXA), absorciometria de raios X de energia única (SXA), tomografia computadorizada quantitativa (TCQ) e ultrassonografia (Heymsfield, Wang et al. 1997; Ellis 2000). Entretanto, somente a DXA será descrita a seguir, tendo em vista que esta será a técnica utilizada no presente estudo para avaliar a massa óssea dos jovens.

A DXA é uma técnica radiográfica considerada padrão-ouro para medir a DMO (Ellis 2000). Embora possa ser usada para as mensurações de qualquer área esquelética, a principal aplicação da DXA tem sido a obtenção da DMO do corpo inteiro e de sítios específicos, como a coluna lombar e o colo do fêmur (Ellis 2000) (Figura 2). Nesta técnica, são usados raios X de dupla energia para estimar a área de tecido mineralizado, e o conteúdo mineral (em gramas) é dividido pela área (em  $\text{cm}^2$ ), o que corrige parcialmente as diferenças decorrentes do tamanho corporal. Esta correção é parcial, pois a DXA é uma técnica de exploração bidimensional, que não estima a profundidade e comprimento pósterio-anterior do osso. Devido a isso, a DMO é expressa em  $\text{g}/\text{cm}^2$ .

Como vantagens da técnica, destaca-se a facilidade para a tomada das medidas, a baixa quantidade de radiações, a ótima qualidade das imagens e o pouco tempo gasto para a realização do exame (Blake and Fogelman 1997).

Para a interpretação dos resultados da DXA, os valores individuais são comparados aos obtidos em uma população jovem (T-score) ou de mesma idade (Z-score), ambas com equivalência de raça e sexo (Fauci, Braunwald et al. 1998; Brandao, Camargos et al. 2009). Este aspecto não será abordado, pois no presente projeto as medidas de massa óssea serão avaliadas de maneira contínua, tendo em vista que a ocorrência de doenças ósseas é baixa entre adolescentes.

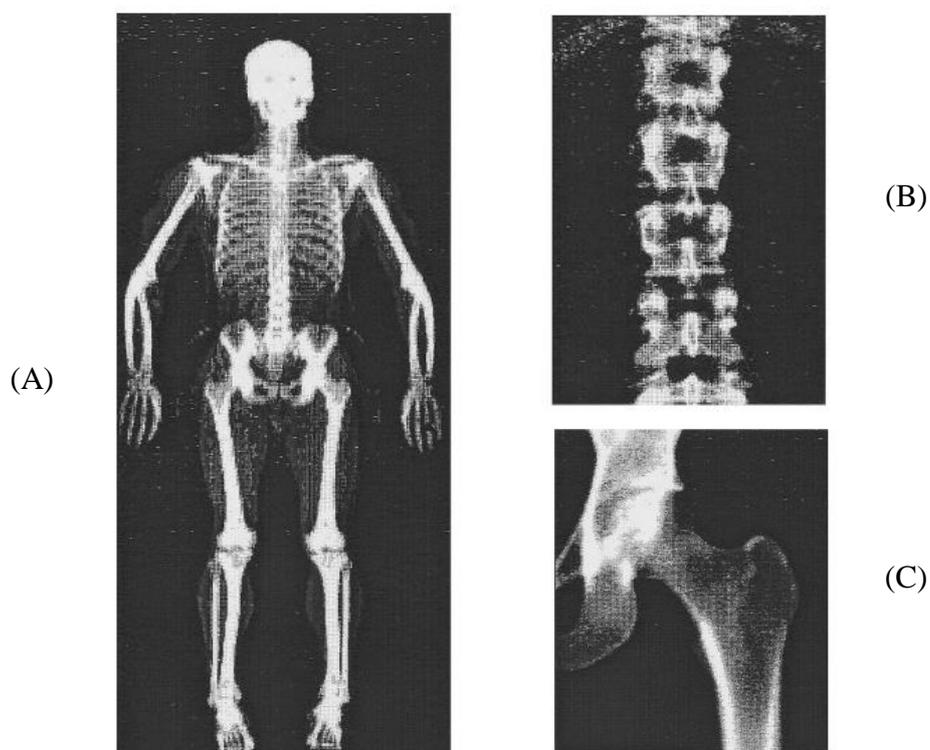


Figura 2. Imagens obtidas pela DXA. (A) Corpo inteiro; (B) Coluna lombar; (C) Colo do fêmur. (Fonte: Ellis, 2000)

### 1.3 Fatores associados à constituição da massa mineral óssea

O crescimento dos ossos e subsequente saúde óssea são influenciados por uma complexa interação de fatores genéticos, demográficos, socioeconômicos, hormonais e ambientais, a exemplo da dieta, entre outros. Além disso, sob a perspectiva dos estudos de ciclo vital, fatores precoces inerentes ao período gestacional e primeiros anos de vida também podem influenciar os desfechos ósseos. Interferências negativas de quaisquer fatores, durante o processo de formação da massa óssea, podem resultar em anomalias e incidência de doenças ósseas. Neste sentido, os principais fatores sociodemográficos, precoces e comportamentais contemporâneos associados ao CMO e/ou DMO, independentemente da fase do ciclo vital, são apresentados a seguir. Vários destes fatores atuam como possíveis mediadores ou fatores de confusão do presente estudo.

#### 1.3.1 Efeito de características sociodemográficas sobre o CMO e/ou DMO

São escassas as referências associando determinantes ou variáveis socioeconômicas e demográficas com o CMO e/ou DMO. Na maioria dos estudos estas variáveis têm sido utilizadas como fatores de confusão para as análises ajustadas.

Apesar disso, considerando-se o sexo e a cor da pele como características demográficas, a literatura disponível é consistente em mostrar que indivíduos do sexo feminino (Maynard, Guo et al. 1998; Bratteb, Samuelson et al. 2002; Lantz, Bratteby et al. 2008) e de cor da pele branca (Looker, Melton et al. 2009; Chantler, Dickie et al. 2011) possuem menores valores de CMO e DMO, em todas as idades.

Em relação às características socioeconômicas, Clark *et al.* (2005), estudando a coorte de ALSPAC aos 9,9 anos de idade, observaram que a posição social estava negativamente associada com a DMO na infância, como consequência da maior altura atingida pelas crianças mais ricas (Clark, Ness et al. 2005).

### 1.3.2 Efeito de exposições precoces sobre o CMO e/ou DMO

O período gestacional tem grande importância na programação da massa óssea de um indivíduo, visto que condições uterinas adversas limitam o crescimento e ganho de peso e a posterior trajetória de desenvolvimento esquelético (Steer and Tobias 2011). Em apoio a esta hipótese, várias características relacionadas à vida intrauterina parecem estar associadas ao desenvolvimento ósseo, tal como tem sido observado em recém-nascidos e em idades posteriores.

Exposições como crescimento fetal (Jensen, Vielwerth et al. 2008), estado nutricional pré-gestacional (Ganpule, Yajnik et al. 2006), exposição a raios ultravioleta no terceiro trimestre da gestação (Steer and Tobias 2011; Sayers and Tobias 2009) e dieta da gestante, incluindo o consumo de proteínas, cálcio, fósforo, magnésio, potássio, ácido fólico e vitamina D (Ganpule, Yajnik et al. 2006; Sayers and Tobias 2009; Javaid, Crozier et al. 2006; Tobias, Steer et al. 2005; Jones, Riley et al. 2000) têm mostrado associação positiva com CMO, DMO e risco de fraturas em diferentes idades (da infância à adolescência).

O fumo materno durante a gestação, por sua vez, apresenta relação inversa com a massa óssea de recém-nascidos (Godfrey, Walker-Bone et al. 2011) e de adolescentes (Jones, Riley et al. 1999). A idade gestacional é outra característica que apresenta associação negativa

com a massa óssea. Estudos têm mostrado que nascidos pré-termo (antes de 37 semanas de gestação) têm menores valores de CMO e DMO do que aqueles nascidos a termo (Avila-Diaz, Flores-Huerta et al. 2001; Beltrand, Alison et al. 2008; Fewtrell, Williams et al. 2009; De Curtis, Pieltain et al. 2002; Dalziel, Fenwick et al. 2006; Bowden, Jones et al. 1999; Gianni, Mora et al. 2008; Lapillonne, Salle et al. 2004).

O peso e comprimento ao nascer também são fatores a serem considerados. Vários estudos indicam a existência de uma relação positiva entre peso ao nascer e os valores de CMO e/ou DMO na infância, adolescência e início da idade adulta (Steer and Tobias 2011; Jones and Dwyer 2000; Fewtrell, Prentice et al. 2000; Schlusser, de Castro et al. 2010). Associação positiva entre comprimento ao nascer e massa óssea em etapas posteriores também foi observada (Ganpule, Yajnik et al. 2006; Cooper, Eriksson et al. 2001), sendo o menor comprimento ao nascer considerado como preditor de fratura de quadril na idade adulta (Cooper, Eriksson et al. 2001).

A associação entre exposições durante o primeiro ano de vida e massa óssea em distintas faixas etárias também tem sido avaliada em diversos estudos. O efeito da amamentação sobre medidas de massa óssea em idades posteriores tem mostrado resultados contraditórios. Alguns autores têm encontrado efeito positivo do aleitamento materno sobre a massa óssea na infância e em outras idades (Jones, Riley et al. 2000; Ma and Jones 2002; Molgaard, Larnkjaer et al. 2011; Pirila, Taskinen et al. 2011). Outros estudos, entretanto, não evidenciaram associação ou encontraram efeito negativo da amamentação sobre desfechos de massa óssea (Zuccotti, Viganò et al. 2011; Young, Antonson et al. 2005; Harvey, Robinson et al. 2009). Uma abordagem mais detalhada acerca da relação entre amamentação e CMO e/ou DMO será apresentada em outra seção deste projeto, tendo em vista que a amamentação é uma das exposições de interesse deste estudo.

Além da amamentação, é crescente o interesse pelos efeitos do peso corporal e do crescimento nos primeiros anos de vida sobre os desfechos ósseos. O peso ao final do primeiro ano de vida esteve positivamente associado com diferentes medidas de massa óssea aos 10 anos de idade (Vidulich, Norris et al. 2007) e com o CMO de mulheres no início da idade adulta (Cooper, Cawley et al. 1995). Relação positiva também foi observada entre o peso no segundo ano de vida e a massa óssea na idade adulta (Oliver, Jameson et al. 2007).

Assim como o peso, o crescimento nos primeiros anos de vida tem sido associado de forma positiva com a DMO na infância e adolescência (Ay, Jaddoe et al. 2011). Entretanto, estudos sobre a associação do crescimento na infância e CMO e/ou DMO na idade adulta são pouco frequentes, em parte, pela falta de dados disponíveis para tais análises. Segundo Cooper *et al.* (2001), as baixas taxas de crescimento durante a infância mantêm seu efeito negativo até idades avançadas, sendo importantes preditores de fraturas no quadril (Cooper, Eriksson et al. 2001).

### 1.3.3 Efeito de exposições comportamentais contemporâneas sobre o CMO e/ou DMO

Assim como as características precoces supracitadas, fatores comportamentais apresentam importante influência sobre a saúde óssea de um indivíduo. Dentre estes fatores, a dieta tem papel proeminente. Muitos dos nutrientes ou componentes alimentares, os quais têm recebido atenção de pesquisadores, estão diretamente envolvidos no metabolismo ósseo ou indiretamente relacionados ao processo de crescimento, através da ação sobre moduladores do crescimento. Dependendo do nutriente e/ou alimento, os efeitos sobre a absorção e excreção urinária de cálcio podem ser positivos (cálcio, vitamina D, etc) ou negativos (gorduras, cafeína, proteína animal, etc) (Prentice 2004). Tal fato é de grande interesse, pois mais de

99% do cálcio presente no corpo humano encontra-se no esqueleto e, portanto, efeitos sobre a retenção de cálcio podem indicar efeitos imediatos ou futuros sobre a massa mineral óssea (Prentice 2004; Prentice, Bonjour et al. 2003). Entretanto, o estudo de nutrientes isolados ou alimentos específicos pode não representar adequadamente o efeito sinérgico dos nutrientes e/ou alimentos na prevenção e/ou desenvolvimento de doenças. Neste sentido, o uso dos padrões alimentares como exposição em epidemiologia nutricional supera limitações desde a incapacidade na detecção de pequenos efeitos de simples nutrientes até a dificuldade na avaliação das intercorrelações e das interações entre os mesmos. Uma descrição acerca dos padrões alimentares, bem como sua associação com medidas de massa óssea serão discutidas em outras seções deste projeto, visto que os padrões alimentares configuram outra exposição de interesse neste estudo.

Além da dieta, outros fatores como o consumo de álcool, tabagismo, atividade física, uso de contraceptivos orais, entre outros, podem ter influência sobre a saúde óssea. O consumo excessivo de álcool associa-se negativamente à massa mineral óssea (Grainge, Coupland et al. 1998), embora, o consumo moderado de bebidas desse tipo tenha se mostrado favorável à DMO (Wosje and Kalkwarf 2007; Williams, Cherkas et al. 2005; Ilich, Brownbill et al. 2002; Ganry, Baudoin et al. 2000; Feskanich, Korrick et al. 1999; Felson, Zhang et al. 1995). Com relação ao tabagismo, a literatura é consistente quanto aos efeitos negativos do fumo sobre as medidas de massa óssea (Grainge, Coupland et al. 1998; Kuo, Chang et al. 2008; Elgan, Samsioe et al. 2003; Lorentzon, Mellstrom et al. 2007; Ruffing, Cosman et al. 2006). Por sua vez, maiores níveis de atividade física têm se mostrado favoráveis à formação e manutenção da massa óssea em todas as fases da vida (Harvey, Cole et al. 2011; Anderson 2000; Hasselstrom, Karlsson et al. 2007; Boot, Ridder et al. 1997; Gracia-Marco, Moreno et

al. 2011; Bakker, Twisk et al. 2003; Mavroei, Stewart et al. 2009; Bleicher, Cumming et al. 2011).

Acerca das características relacionadas à reprodução, há controvérsias sobre o efeito do uso de contraceptivos orais sobre medidas de massa óssea. Alguns estudos transversais têm encontrado efeito negativo do uso de contraceptivos orais sobre valores de DMO em mulheres jovens (Prior, Kirkland et al. 2001; Scholes, Ichikawa et al. 2010; Shoepe and Snow 2005; Hartard, Kleinmond et al. 2007; Pikkarainen, Lehtonen-Veromaa et al. 2008), enquanto outros não encontraram associação ou mostraram efeitos positivos (Stevenson, Lees et al. 1989; Lloyd, Buchanan et al. 1989; Allali, El Mansouri et al. 2009).

Além desses fatores, o peso e/ou estado nutricional também influenciam o CMO e a DMO de um indivíduo. Maiores valores de índice de massa corporal (IMC) têm se mostrado associados positivamente com a DMO (Beck, Oreskovic et al. 2001), levando falsamente a acreditar que o excesso de peso favorece a formação e manutenção da massa mineral óssea. Todavia, o efeito positivo de maiores valores de IMC se deve à maior osteogênese ocasionada pela sobrecarga mecânica devida ao maior peso corporal (Beck, Oreskovic et al. 2001).

Com relação à composição corporal, os achados são inconclusivos. Alguns estudos mostram efeito positivo da massa gorda sobre as medidas de massa óssea (Reid, Plank et al. 1992; Andreoli, Bazzocchi et al. 2011; El Hage, Jacob et al. 2011), enquanto outros não encontram associação ou mostram efeito negativo (Viljakainen, Pekkinen et al. 2011; Zagarins, Ronnenberg et al. 2010). Quanto à massa magra, vários estudos apontam relação positiva com o CMO e/ou DMO (Liu-Ambrose, Kravetsky et al. 2006; Marin, Pedrosa et al. 2010; Ho-Pham, Nguyen et al. 2010).

### 1.3.3.1 Padrões alimentares

O uso dos padrões alimentares para avaliar o consumo alimentar é, hoje, uma ferramenta bastante utilizada em estudos de epidemiologia nutricional. Padrão alimentar pode ser definido como “o conjunto ou grupo de alimentos consumidos por uma dada população” (Kant 2004). Em outras palavras, os padrões alimentares representam uma maneira abrangente de mostrar as características gerais da composição da dieta dos indivíduos.

A identificação dos padrões alimentares baseia-se nos dados de consumo alimentar obtidos a partir de distintos instrumentos que permitem avaliar a alimentação, como o registro alimentar, recordatório de 24 horas e questionário de frequência alimentar. Os métodos estatísticos mais utilizados para derivar padrões alimentares são a análise de agrupamento (*cluster*) e a análise fatorial (Newby and Tucker 2004).

Na análise fatorial, os métodos utilizados para a redução de um grande número de variáveis a um número menor são a Análise de Fator Comum (AFC) e a Análise de Componentes Principais (ACP), sendo esta última usada com maior frequência.

A ACP tem como objetivos descrever de forma resumida um grande número de variáveis e obter índices sintéticos, os componentes, que são as dimensões subjacentes que se identificam e podem ser nomeados (Newby and Tucker 2004). Nesse tipo de análise, as variáveis agrupadas em cada fator são mais fortemente correlacionadas entre si do que com as variáveis pertencentes aos outros fatores. Logo, este procedimento possibilita que os itens alimentares contidos no instrumento de avaliação de consumo alimentar sejam agrupados com base no grau de correlação entre eles.

As etapas da ACP incluem: a preparação da matriz de correlação, a extração de um conjunto de fatores da matriz de correlação, a determinação do número de fatores e a rotação dos fatores para aumentar a sua interpretabilidade. A interpretação e a denominação dos padrões alimentares dependem do significado de cada combinação dos itens alimentares observadas no fator e, sobretudo, daqueles itens com maior carga fatorial (Newby and Tucker 2004).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

A revisão de literatura para a elaboração deste projeto foi dividida em duas etapas. A primeira teve o objetivo de identificar estudos acerca do efeito em longo prazo da amamentação sobre a massa óssea. A segunda etapa objetivou verificar a literatura sobre a associação entre padrões alimentares e massa mineral óssea.

Em ambas as etapas, a primeira estratégia de busca sistemática da literatura foi realizada através da base de dados MEDLINE (Pubmed), utilizando *MeSH terms* para a procura das referências (Quadro 1). A busca limitou-se a estudos realizados em seres humanos, publicados em inglês, espanhol e português. Apesar de o presente projeto ser realizado com adolescentes, a idade não foi utilizada como um limite de busca, tendo em vista a escassez de estudos que avaliaram a massa mineral óssea nesse grupo etário.

As referências recuperadas foram importadas para um software específico (EndNote X4, Thompson Reuters Inc.). Posteriormente, foi realizada a leitura dos títulos e exclusão daqueles que não abordavam a associação de interesse. Em seguida, realizou-se a leitura dos resumos e, na sequência, a leitura na íntegra dos artigos considerados relevantes. Após esta

etapa, a lista de referências dos artigos selecionados foi pesquisada para verificar se havia algum estudo de interesse ainda não incluído na revisão.

Como uma segunda estratégia de busca, outras bases de dados também foram consultadas: Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs) e Web of Science (WoS). A busca nestas bases não identificou nenhum estudo diferente daqueles localizados anteriormente na base de dados Pubmed.

O resultado final de todo o processo, para ambas as etapas, encontra-se resumido no Quadro 1.

Quadro 1. Descritores utilizados, estratégia de busca e síntese do número de artigos recuperados no Pubmed.

<b>Descritores</b>	<b>Termos para busca</b>			
Massa óssea	1	<i>“Bone mass” OR “Bone Density” OR “Bone Mineral Density” OR “Bone Mineral Content” OR “Bone Health” OR “Osteoporosis”</i>		
Amamentação	2	<i>“Breast Feeding” OR “Breast Feeding, Exclusive” OR “Breastfeeding” OR “Breastfeeding, Exclusive” OR “Milk, Human”</i>		
Padrões alimentares	3	<i>“Diet” OR “Dietary pattern” OR “Dietary patterns” OR “Food consumption”</i>		
<b>Etapa 1 (amamentação e massa mineral óssea)</b>				
Estratégia de busca*	Artigos			
	Localizados	Títulos selecionados	Resumos selecionados	Artigos de interesse
1 + 2	281	59	16	7**
<b>Etapa 2 (padrões alimentares e massa mineral óssea)</b>				
Estratégia de busca*	Artigos			
	Localizados	Títulos selecionados	Resumos selecionados	Artigos de interesse
1 + 3	2.967	36	9	9

\* Combinação dos termos para busca.

\*\* Foram excluídos os estudos realizados com prematuros (<37 semanas de gestação), pois estes correm o risco de apresentar uma mineralização subótima, tendo em vista que o final do terceiro trimestre de gestação é o momento onde a deposição mineral óssea se dá de forma mais intensa e rápida (Fewtrell 2011). Consequentemente, estes indivíduos tendem a apresentar um déficit mineral ao nascimento, que muitas vezes é agravado pelas dificuldades práticas de garantir um consumo adequado de minerais durante o período neonatal, sobretudo aqueles de menor peso de nascimento e mais doentes (Fewtrell 2011). Logo, é possível que os efeitos da amamentação sobre a massa mineral óssea, em curto e longo prazo, sejam diferentes dos observados em recém-nascidos a termo.

## 2.1 Amamentação e massa mineral óssea

### 2.1.1 Artigos incluídos na revisão

Conforme estratégia de revisão descrita no item 2.0, foram inseridos sete artigos nesta etapa da revisão. Os sete estudos selecionados foram publicados entre os anos de 2000 e 2011, sendo que dois tinham delineamento transversal (Ma, Jones et al. 2002; Young, Antonson et al. 2005) e cinco eram estudos de coorte (Jones, Riley et al. 2000; Molgaard, Larnkjaer et al. 2011; Pirila, Taskinen et al. 2011; Zuccotti, Vigano et al. 2011; Harvey, Robinson et al. 2009). As amostras variaram de 109 (Molgaard, Larnkjaer et al. 2011) a 599 indivíduos (Harvey, Robinson et al. 2009). A maioria dos estudos incluiu crianças (Jones, Riley et al. 2000; Ma, Jones et al. 2002; Zuccotti, Vigano et al. 2011; Young, Antonson et al. 2005; Harvey, Robinson et al. 2009), sendo apenas um realizado com adolescentes (Molgaard, Larnkjaer et al. 2011) e um com adultos jovens (Pirila, Taskinen et al. 2011). Todos os estudos foram realizados em países desenvolvidos, que apresentam contextos diferentes dos países em desenvolvimento como o Brasil.

A amamentação e/ou prática alimentar foi avaliada de formas distintas nos estudos revisados. Alguns autores avaliaram o efeito do leite materno em comparação às fórmulas infantis (Jones, Riley et al. 2000; Zuccotti, Vigano et al. 2011; Young, Antonson et al. 2005). Outros avaliaram o efeito da duração da amamentação total sobre as medidas de massa óssea (Jones, Riley et al. 2000; Molgaard, Larnkjaer et al. 2011; Pirila, Taskinen et al. 2011; Harvey, Robinson et al. 2009). Apenas um estudo avaliou o efeito da duração do aleitamento materno exclusivo sobre o CMO e/ou DMO (Molgaard, Larnkjaer et al. 2011).

Com relação às medidas de massa óssea, somente em dois estudos as mesmas não foram obtidas pela DXA (Ma, Jones et al. 2002; Zuccotti, Vigano et al. 2011). Em um desses,

o desfecho ósseo foi a ocorrência de fraturas previamente ao estudo (Ma, Jones et al. 2002). No outro, a massa óssea foi avaliada através de ultrassonografia da tíbia esquerda (Zuccotti, Vigano et al. 2011). Os cinco estudos que utilizaram a DXA avaliaram o CMO e a DMO (Jones, Riley et al. 2000; Molgaard, Larnkjaer et al. 2011; Pirila, Taskinen et al. 2011; Young, Antonson et al. 2005; Harvey, Robinson et al. 2009). Sobre os sítios anatômicos, dois estudos avaliaram a massa óssea em três sítios: corpo inteiro, coluna lombar e colo do fêmur (Jones, Riley et al. 2000; Pirila, Taskinen et al. 2011); dois estudos avaliaram somente o corpo inteiro (Young, Antonson et al. 2005; Harvey, Robinson et al. 2009) e; um avaliou corpo inteiro e coluna lombar (Molgaard, Larnkjaer et al. 2011).

Acerca das análises, ajustes para peso e altura ou IMC são importantes, pois as medidas de massa mineral óssea, sobretudo o CMO, são influenciadas pelo tamanho do corpo. Levando tal fato em consideração, três estudos não realizaram análise ajustada para pelo menos uma dessas medidas (Zuccotti, Vigano et al. 2011; Young, Antonson et al. 2005; Harvey, Robinson et al. 2009). Outros fatores, como consumo de cálcio dietético, atividade física e exposição à luz solar também foram utilizados como possíveis fatores de confusão.

Um resumo das características e dos principais resultados dos estudos é apresentado no Quadro 2.

### 2.1.2 Efeito da amamentação sobre a massa mineral óssea

Os efeitos em longo prazo da amamentação sobre as medidas de massa óssea apresentaram resultados contraditórios. Alguns estudos mostraram efeito positivo do aleitamento materno sobre a massa óssea de crianças, adolescentes e adultos jovens (Jones,

Riley et al. 2000; Ma, Jones et al. 2002; Molgaard, Larnkjaer et al. 2011; Pirila, Taskinen et al. 2011), sendo que em um deles a associação foi observada apenas entre os indivíduos do sexo masculino (Pirila, Taskinen et al. 2011). Outros, entretanto, não evidenciaram associação entre amamentação e desfechos de saúde óssea, aos quatro e doze meses (Zuccotti, Vigano et al. 2011) e quatro anos idade (Young, Antonson et al. 2005; Harvey, Robinson et al. 2009).

Dentre os estudos que encontraram efeito positivo, Jones *et al.* (2000) constataram que as crianças alimentadas com leite materno tiveram maior massa óssea do que aquelas alimentadas com fórmula infantil, aos oito anos de idade (Jones, Riley et al. 2000). O leite humano, comparado às fórmulas infantis e outros tipos de leite, apresenta menor concentração de nutrientes fundamentais para a mineralização óssea, como cálcio, fósforo e vitamina D (Jones, Riley et al. 2000). Frente a isso, possíveis explicações para o efeito benéfico do leite materno são: (1) apesar da menor concentração de minerais no leite humano, a biodisponibilidade e absorção desses nutrientes são maiores, comparado aos outros tipos de leite (Jones, Riley et al. 2000); (2) o consumo de leite materno resulta, em média, na ingestão de 200mg de cálcio por dia (Prentice 2003; Ong, Preece et al. 2002), quantidade esta suficiente para promover um ótimo desenvolvimento esquelético na infância, o qual se mantém em idades posteriores (Bates and Prentice 1994); e (3) o efeito potencializador do leite materno sobre o desenvolvimento ósseo pode ser decorrente da presença de algum fator não nutricional (Fewtrell 2011).

Em relação ao tempo de amamentação, Jones *et al.* (2000) e Molgaard *et al.* (2011) mostraram que crianças amamentadas por mais tempo tiveram maiores valores de massa óssea aos oito e 17 anos de idade, respectivamente (Jones, Riley et al. 2000; Molgaard, Larnkjaer et al. 2011). Contrariamente, Pirila *et al.* (2011) observaram que homens amamentados por menos de três meses tinham aos 32 anos de idade maiores valores de CMO

e DMO do que aqueles com amamentação prolongada (maior do que sete meses) (Pirila, Taskinen et al. 2011). Uma explicação para esse achado é que nos primeiros seis meses de vida o teor de cálcio presente no leite materno é relativamente constante, diminuindo em torno de 20% a 30% quando a lactação se estende além do sexto mês (Prentice, Jarjou et al. 1995). A partir do sexto mês de vida, se a criança não tiver uma alimentação complementar suficiente e adequada em termos nutricionais, o teor de cálcio presente no leite materno pode ser insuficiente para promover um adequado crescimento e desenvolvimento ósseo. Além disso, a absorção intestinal e excreção urinária de cálcio pode ser afetada pelo tipo de alimento consumido, comprometendo o processo de mineralização óssea (Prentice 2004).

Tentar realizar estimativas globais destes estudos e avaliar o potencial efeito da amamentação sobre as medidas de massa óssea em longo prazo é difícil, tendo em vista as distintas populações estudadas e as diferentes maneiras de categorizar a prática da amamentação e/ou alimentação nos primeiros meses de vida.

A falta de associação observada em alguns estudos (Zuccotti, Viganò et al. 2011; Young, Antonson et al. 2005; Harvey, Robinson et al. 2009) pode ser consequência dos pequenos tamanhos amostrais e, da falta de ajuste para peso, altura ou IMC, o que pode ter confundido negativamente a associação.

Logo, a partir desta revisão fica claro que não existe consenso acerca do real efeito em longo prazo da amamentação sobre as medidas de massa óssea, não sendo possível saber a direção e magnitude deste efeito.

Quadro 2. Principais estudos que avaliaram a associação entre amamentação e massa mineral óssea em diferentes fases do ciclo vital.

País Autor (ano)	Amostra Delineamento	Exposição Fatores de confusão (FC)	Desfecho (idade no desfecho)	Principais resultados
<b>Austrália</b> Jones (2000)	N= 330 crianças de ambos os sexos; Coorte	<u>Alimentação</u> : dicotômica (alimentadas com leite materno; alimentadas com fórmula infantil); duração do aleitamento materno (não amamentadas; <3 meses; ≥3 meses)  <u>FC</u> : sexo, altura e peso atual, idade de introdução de alimentos sólidos, atividade física, exposição à luz solar, consumo de cálcio	<u>Massa óssea</u> : CMO e DMO (corpo inteiro, coluna lombar; colo do fêmur) obtidos pela DXA (8 anos de idade)	Crianças alimentadas com leite materno tiveram maior DMO no colo do fêmur (+0,20 DP, $p=0,07$ ), coluna lombar (+0,25 DP, $p=0,03$ ) e corpo inteiro (+0,29 DP, $p=0,006$ ) comparado àquelas alimentadas com fórmula infantil  Amamentação <3 meses não foi associada com aumento da massa óssea em nenhum dos sítios avaliados
<b>Austrália</b> Ma (2002)	N=324 crianças de ambos os sexos; Transversal	<u>Alimentação</u> : avaliada de forma dicotômica (amamentação: sim; não)  <u>FC</u> : sexo, altura, peso, densidade óssea areal na coluna vertebral	<u>Massa óssea</u> : ocorrência de fraturas (definida como qualquer fratura ocorrida antes do estudo) (8 anos de idade)	Fraturas menos prevalentes entre as crianças amamentadas (OR: 0,43; IC95% 0,19 - 0,94), após ajuste para sexo, altura, peso e densidade óssea areal da coluna vertebral
<b>Estados Unidos</b> Young (2005)	N=178 crianças de ambos os sexos; Transversal	<u>Alimentação</u> : grupo 1 (leite materno exclusivo); grupo 2 (fórmula infantil sem óleo de palma); grupo 3 (fórmula infantil com óleo de palma); alimentação nos primeiros 4 meses de vida  <u>FC</u> : sem análise ajustada	<u>Massa óssea</u> : CMO e DMO (corpo inteiro) obtidos pela DXA (4 anos de idade)	Aos 4 anos de idade não se observou diferença significativa no CMO ( $p=0,51$ ) e DMO ( $p=0,89$ ) entre os 3 grupos de alimentação, nos primeiros 4 meses de vida

<b>País Autor (ano)</b>	<b>Amostra Delineamento</b>	<b>Exposição Fatores de confusão (FC)</b>	<b>Desfecho (idade no desfecho)</b>	<b>Principais resultados</b>
<b>Reino Unido</b> Harvey (2009)	N=599 crianças de ambos os sexos; Coorte	<u>Alimentação</u> : duração da amamentação (definida a partir da data da última mamada; categorizada em: nunca tentei, <1 mês, 1-3 meses, 4-6 meses, 7-11 meses, ≥ 12 meses)  <u>FC</u> : sem análise ajustada para duração da amamentação vs. massa óssea	<u>Massa óssea</u> : CMO e DMO (corpo inteiro) obtidos pela DXA (4 anos de idade)	Sem associação entre duração da amamentação e massa óssea aos 4 anos de idade
<b>Dinamarca</b> Molgaard (2011)	N=109 adolescentes de ambos os sexos; Coorte	<u>Alimentação</u> : duração do aleitamento materno exclusivo e outros tipos de aleitamento materno até os 9 meses de vida; crianças amamentadas pelo menos 1 vez/dia foram consideradas amamentadas  <u>FC</u> : sexo, altura, peso	<u>Massa óssea</u> : CMO, área óssea e DMO (corpo inteiro e coluna lombar) obtidos pela DXA (17 anos de idade)	Duração da amamentação exclusiva foi positivamente correlacionada com CMO, área óssea e DMO da coluna lombar (ajustadas para sexo) e CMO da coluna lombar ajustada para tamanho
<b>Itália</b> Zuccotti (2011)	N=116 crianças de ambos os sexos; Coorte	<u>Alimentação</u> : tipo de alimentação (aleitamento materno, fórmula infantil, mista)  <u>FC</u> : sem análise ajustada	<u>Massa óssea</u> : avaliada por ultrassonografia da tíbia esquerda (4 e 12 meses de idade)	Não foi observado efeito do tipo de alimentação sobre a massa óssea

País Autor (ano)	Amostra Delineamento	Exposição Fatores de confusão (FC)	Desfecho (idade no desfecho)	Principais resultados
<p><b>Finlândia</b> Pirilä (2011)</p>	<p>N=158 adultos de ambos os sexos; Coorte</p>	<p><u>Alimentação</u>: tempo total do aleitamento materno dividido em 3 grupos: curto (<math>\leq 3</math> meses); intermediário (3-7 meses) e prolongado (<math>\geq 7</math> meses)</p> <p><u>FC</u>: sexo, consumo de cálcio dietético, atividade física, tabagismo, consumo de álcool, gravidez, fraturas, peso, altura, índice de massa corporal, mudança de peso durante a vida adulta, peso ao nascer</p>	<p><u>Massa óssea</u>: CMO, DMO e área óssea (coluna lombar, colo do fêmur e corpo inteiro) obtidos pela DXA (32 anos de idade)</p>	<p><u>Homens</u>: amamentação por <math>\leq 3</math> meses foi associada com maior área óssea, CMO e DMO, comparado à amamentação por <math>\geq 7</math> meses; homens no grupo de aleitamento materno curto tiveram uma DMO (corpo inteiro) em média 4,7% maior que homens no grupo de aleitamento prolongado; após controle para múltiplos FC, a influencia da duração do aleitamento materno sobre características ósseas permaneceu; diferenças entre os 3 grupos de amamentação foram observadas na área óssea e CMO (coluna lombar) e DMO (corpo inteiro) favorecendo o grupo amamentado por <math>\leq 3</math> meses</p> <p><u>Mulheres</u>: não foi observada associação</p>

## 2.2 Padrões alimentares e massa mineral óssea

### 2.2.1 Artigos incluídos na revisão

Nesta etapa da revisão foram inseridos nove artigos publicados entre os anos de 2002 e 2012. Desses, cinco estudos tinham delineamento transversal (Tucker, Chen et al. 2002; Okubo, Sasaki et al. 2006; Kontogianni, Melistas et al. 2009; McNaughton, Wattanapenpaiboon et al. 2011; Whittle, Woodside et al. 2012) e quatro eram estudos de coorte (Wosje, Khoury et al. 2010; Langsetmo, Poliquin et al. 2010; Langsetmo, Hanley et al. 2011; Noh, Song et al. 2011). As amostras variaram de 196 (Kontogianni, Melistas et al. 2009) a 5.188 indivíduos (Langsetmo, Hanley et al. 2011). A maioria dos estudos foi realizada com adultos (Okubo, Sasaki et al. 2006; Kontogianni, Melistas et al. 2009; McNaughton, Wattanapenpaiboon et al. 2011; Whittle, Woodside et al. 2012; Langsetmo, Poliquin et al. 2010; Langsetmo, Hanley et al. 2011), sendo um estudo realizado com crianças (Wosje, Khoury et al. 2010), um com adolescentes (Noh, Song et al. 2011) e um com idosos (Tucker, Chen et al. 2002). Dos nove estudos, quatro incluíram na amostra apenas mulheres (Okubo, Sasaki et al. 2006; Kontogianni, Melistas et al. 2009; McNaughton, Wattanapenpaiboon et al. 2011; Noh, Song et al. 2011). Todos os estudos foram realizados em países desenvolvidos.

Com relação aos padrões alimentares, em seis estudos os padrões foram obtidos a partir de análise fatorial (Okubo, Sasaki et al. 2006; Kontogianni, Melistas et al. 2009; McNaughton, Wattanapenpaiboon et al. 2011; Whittle, Woodside et al. 2012; Langsetmo, Poliquin et al. 2010; Langsetmo, Hanley et al. 2011), sendo que em três destes estudos, o método fatorial utilizado foi a ACP (Kontogianni, Melistas et al. 2009; McNaughton, Wattanapenpaiboon et al. 2011; Whittle, Woodside et al. 2012). Ainda, um estudo (Tucker,

Chen et al. 2002) gerou os padrões por análise de agrupamento (*cluster*) e dois estudos através do método de regressão de classificação reduzida (Wosje, Khoury et al. 2010; Noh, Song et al. 2011). Em relação ao tipo de inquérito dietético aplicado, em três estudos o consumo alimentar foi avaliado a partir de um QFA, com períodos recordatórios de um mês (Langsetmo, Poliquin et al. 2010; Langsetmo, Hanley et al. 2011) e 12 meses (Tucker, Chen et al. 2002), respectivamente. Em três estudos, foi aplicado registro alimentar de no mínimo três dias consecutivos (Kontogianni, Melistas et al. 2009; McNaughton, Wattanapenpaiboon et al. 2011; Wosje, Khoury et al. 2010), dois estudos utilizaram história dietética (Okubo, Sasaki et al. 2006; Whittle, Woodside et al. 2012) e um aplicou um recordatório de 24 horas e registro alimentar de dois dias consecutivos (Noh, Song et al. 2011).

Em relação às medidas de massa óssea, apenas em um estudo (Langsetmo, Hanley et al. 2011) as mesmas não foram obtidas pela DXA, tendo em vista que o desfecho primário do estudo era a incidência de fraturas. Além disso, um estudo (Tucker, Chen et al. 2002) utilizou, além da DXA, a SXA para avaliar a DMO de um dos sítios anatômicos estudados. Dos oito estudos que utilizaram a DXA, cinco avaliaram o CMO e a DMO (Okubo, Sasaki et al. 2006; Kontogianni, Melistas et al. 2009; McNaughton, Wattanapenpaiboon et al. 2011; Whittle, Woodside et al. 2012; Noh, Song et al. 2011), dois avaliaram apenas a DMO (Tucker, Chen et al. 2002; Langsetmo, Poliquin et al. 2010) e um avaliou a massa óssea (Wosje, Khoury et al. 2010). Os sítios anatômicos avaliados diferiram bastante entre os estudos.

Em relação às análises, apenas um estudo não realizou ajuste para peso, altura ou IMC (Langsetmo, Hanley et al. 2011). Outros fatores, como consumo de cálcio dietético, atividade física e tabagismo também foram utilizados como possíveis fatores de confusão nos diferentes estudos.

Um resumo das características e dos principais resultados dos estudos é apresentado na Quadro 3.

### 2.2.2 Associação entre padrões alimentares e massa mineral óssea

Dentre os nove estudos incluídos nesta etapa da revisão, foram identificados diferentes padrões alimentares, caracterizados pela combinação de distintos alimentos e nutrientes. Apesar da heterogeneidade dos padrões, a maioria dos estudos foi consistente quanto aos seus achados.

Sete estudos encontraram associação positiva entre as medidas de massa óssea e um padrão alimentar caracterizado por elevado consumo de frutas, legumes e/ou verduras (FLV) (Tucker, Chen et al. 2002; Okubo, Sasaki et al. 2006; McNaughton, Wattanapenpaiboon et al. 2011; Wosje, Khoury et al. 2010; Langsetmo, Poliquin et al. 2010; Langsetmo, Hanley et al. 2011; Noh, Song et al. 2011). Em dois desses estudos, a associação foi observada apenas entre os homens (Tucker, Chen et al. 2002; Langsetmo, Poliquin et al. 2010), em dois, apenas entre mulheres (Okubo, Sasaki et al. 2006; McNaughton, Wattanapenpaiboon et al. 2011) e, em dois, entre crianças (Wosje, Khoury et al. 2010) e adolescentes (Noh, Song et al. 2011) do sexo feminino.

Associação negativa entre um padrão rico em energia (caracterizado por elevado consumo de refrigerantes, doces, carnes processadas e gorduras) e medidas de massa óssea foi observada em cinco estudos (Tucker, Chen et al. 2002; Okubo, Sasaki et al. 2006; McNaughton, Wattanapenpaiboon et al. 2011; Whittle, Woodside et al. 2012; Langsetmo, Poliquin et al. 2010), dos quais três encontraram associação apenas entre mulheres (Tucker,

Chen et al. 2002; Okubo, Sasaki et al. 2006; McNaughton, Wattanapenpaiboon et al. 2011) e um apenas entre homens (Whittle, Woodside et al. 2012).

A possível explicação para esses achados consiste na compreensão do equilíbrio ácido-base do organismo, para o qual alguns componentes da dieta contribuem. A manutenção do pH dentro de limites compatíveis com o bom funcionamento celular exige um equilíbrio entre a quantidade de ácidos/prótons (produtos do metabolismo celular) e bases/ânions (provenientes dos alimentos ou liberados pelo tecido ósseo) livres nos compartimentos intra e extracelulares (Prynne, Ginty et al. 2004). O consumo de alimentos, como frutas e vegetais, resulta num ambiente mais alcalino, o qual tem mostrado reduzir a excreção de cálcio urinário. Logo, FLV tem um efeito anabólico sobre o tecido ósseo. Outros alimentos e/ou compostos presentes nos alimentos, como refrigerantes, carne vermelha, gorduras, fitatos, oxalatos, sódio e cafeína, contribuem para a carga metabólica ácida, inibindo a absorção de cálcio ou aumentando a sua excreção urinária (Prynne, Ginty et al. 2004). Neste sentido, o consumo de frutas e vegetais tem sido associado a maior massa óssea (Prynne, Mishra et al. 2006; Tylavsky, Holliday et al. 2004), ao passo que o consumo de doces, bebidas carbonatadas, alimentos a base de carne vermelha e gorduras têm sido relacionados a menores valores de CMO e/ou DMO (McGartland, Robson et al. 2003).

Com relação ao consumo de FLV, outros mecanismos têm sido aventados a fim de explicar o seu efeito positivo sobre a massa mineral óssea. Além de fornecerem ânions para neutralizar os prótons resultantes do metabolismo celular, frutas e vegetais são ricos em substâncias antioxidantes como vitamina C e  $\beta$ -caroteno, os quais atuam no combate ao estresse oxidativo, fenômeno que tem mostrado estar associado negativamente a DMO em adultos (Basu, Michaelsson et al. 2001).

Acerca do efeito negativo de alimentos densamente calóricos, como os refrigerantes, tem sido postulado que o consumo destas bebidas muitas vezes ocorre em substituição à ingestão de leite (Harnack, Stang et al. 1999), o qual tem um grande efeito anabólico sobre o tecido ósseo (Sterle, Sabatier et al. 2009). Além disso, o efeito deletério dessas bebidas pode ocorrer por intermédio de alguns dos seus componentes, como fósforo (Wyshak 2000) ou cafeína (Massey and Whiting 1993). Ainda, um padrão alimentar denso em energia inclui alimentos ricos em carboidratos, gorduras ou ambos. Tem sido documentada relação negativa entre densidade óssea e padrões alimentares com elevado conteúdo de açúcar (Tucker, Chen et al. 2002), gordura insaturada e gordura saturada (Fung, Stampfer et al. 2004).

A identificação de padrões alimentares é útil na investigação da relação entre dieta e desfechos de saúde, principalmente quando a causa está vinculada a várias características alimentares, como é o caso do objeto de pesquisa deste projeto. Entretanto, os padrões geralmente são derivados sem uma hipótese *a priori*, podendo ser adequados para uma amostra particular, mas não representarem, necessariamente, padrões de dietas ideais. Além disso, por serem específicos para uma amostra, os padrões derivados empiricamente podem não se repetir em outras populações, o que dificulta as comparações entre os estudos. Neste sentido, dada a heterogeneidade dos grupos populacionais avaliados nos estudos inseridos nesta revisão, é difícil chegar a conclusão de qual seria o padrão alimentar que melhor explicaria a variabilidade das medidas de massa óssea. Tendo em vista a subjetividade inerente a construção dos padrões e a liberdade que o pesquisador tem para agrupar os alimentos de acordo com o seu propósito de estudo, para estudar a relação entre padrões e desfechos ósseos os alimentos deveriam ser agrupados de acordo com a sua contribuição para o equilíbrio ácido-base, a fim de obter um padrão capaz de otimizar a mineralização óssea.

Quadro 3. Principais estudos que avaliaram a associação entre padrões alimentares e massa mineral óssea.

País Autor (ano)	Amostra Delineamento	Exposição (idade na exposição*) Fatores de confusão (FC)	Desfecho (idade no desfecho)	Principais resultados
<p><b>Estados Unidos</b> Tucker (2002)</p>	<p>N=907 indivíduos de ambos os sexos; Transversal *The Framingham Osteoporosis Study</p>	<p><u>Padrões alimentares</u>: obtidos por análise de cluster; inquérito dietético: questionário de frequência alimentar</p> <p><u>FC</u>: idade, IMC, altura, atividade física, tabagismo, consumo energético, uso de suplemento de cálcio e vitamina D, uso de estrogênio (para mulheres)</p>	<p><u>Massa óssea</u>: DMO do fêmur direito proximal (colo do fêmur, trocanter, área de Ward) obtidos pela DXA; DMO do eixo do rádio obtido por SXA (idades entre 69 e 93 anos)</p>	<p>Foram identificados 6 padrões alimentares</p> <p><u>Homens</u>: em todos os sítios avaliados, maiores médias de DMO foram observadas para o padrão “frutas, verduras e cereais” (caracterizado por elevado consumo de frutas, vegetais, cereais, e menor consumo de carnes vermelhas e processadas, doces e refrigerantes), comparado aos demais padrões</p> <p><u>Mulheres</u>: menores médias de DMO foram observadas para o padrão “doces” (elevado consumo de doces)</p>
<p><b>Japão</b> Okubo (2006)</p>	<p>N=291 mulheres da zona rural; Transversal</p>	<p><u>Padrões alimentares</u>: obtido por análise fatorial; inquérito dietético: história dietética (último mês)</p> <p><u>FC</u>: peso, altura, atividade física, tabagismo, história de fraturas, uso de suplementos, estado menopausal, uso atual de hormônios, paridade e idade da menarca</p>	<p><u>Massa óssea</u>: CMO e DMO (antebraço não dominante) obtidos pela DXA (idades entre 40 e 44 anos)</p>	<p>Foram identificados 4 padrões alimentares</p> <p>O maior quintil do padrão “saudável” (elevado consumo de vegetais verdes e brancos, cogumelos, peixe, mariscos, algas e produtos a base de soja) teve maior média de DMO, comparado ao menor quintil deste padrão (Q5: <math>0,498 \pm 0,006</math>; Q1: <math>0,476 \pm 0,006</math>; <math>p=0,014</math>)</p> <p>O maior quintil do padrão “ocidental” (rico em gorduras e óleos, carne, carnes processadas e temperos) teve menor média de DMO, comparado ao menor quintil (Q5: <math>0,480 \pm 0,006</math>; Q1: <math>0,500 \pm 0,006</math>; <math>p=0,043</math>)</p>

<b>País Autor (ano)</b>	<b>Amostra Delineamento</b>	<b>Exposição (idade na exposição*) Fatores de confusão (FC)</b>	<b>Desfecho (idade no desfecho)</b>	<b>Principais resultados</b>
<b>Grécia</b> Kontogianni (2009)	N=196 mulheres; Transversal	<u>Padrões alimentares</u> : obtidos por análise de componentes principais; inquérito dietético: registro alimentar de 3 dias consecutivos, sendo um dia de final de semana  <u>FC</u> : idade, situação da menstruação, IMC, tabagismo, atividade física, consumo energético	<u>Massa óssea</u> : CMO (corpo inteiro) e DMO (coluna lombar) obtidos pela DXA (média de idade 48 ± 12 anos)	Foram identificados 10 padrões alimentares  Padrão 3 (elevado consumo de peixe, azeite de oliva e baixo consumo de carne vermelha e produtos a base de carne) foi positivamente associado à DMO da coluna lombar ( $\beta=0,185$ ; $p=0,02$ ) e CMO do corpo inteiro ( $\beta=0,140$ ; $p=0,05$ ), assumindo um nível de significância de 10%
<b>Canadá</b> Langsetmo (2010)	N=6.539 indivíduos de ambos os sexos; Coorte	<u>Padrões alimentares</u> : obtidos por análise fatorial; inquérito dietético: questionário de frequência alimentar (aplicado no 2º ano de acompanhamento, 1997-99)  <u>FC</u> : idade, altura, escolaridade, tabagismo, consumo de bebida alcoólica, atividade física, consumo de leite, uso de suplementos (cálcio e vitamina D), uso de corticoides, menopausa recente (<5 anos)	<u>Massa óssea</u> : DMO (colo do fêmur) obtida pela DXA (idade $\geq 25$ anos); massa óssea avaliada no 5º ano do estudo, 2000-02	Foram identificados 2 padrões alimentares  <u>Homens</u> (25-49 anos): associação positiva entre o padrão “denso em nutriente” (elevado consumo de frutas, vegetais e grãos integrais) e DMO ( $\beta=0,012$ ; IC95% 0,002; 0,022); ( $\geq 50$ anos): associação negativa entre o padrão “denso em energia” (elevado consumo de refrigerantes, batata frita, hambúrguer, cachorro quente, bacon, linguiça, bolos, chocolate e sorvetes) e DMO ( $\beta=0,009$ ; IC95% 0,002; 0,016)  <u>Mulheres</u> : (pós-menopausa): associação negativa entre o padrão “denso em energia” e DMO ( $\beta=0,004$ ; IC95% 0,000; 0,008)

País Autor (ano)	Amostra Delineamento	Exposição (idade na exposição*) Fatores de confusão (FC)	Desfecho (idade no desfecho)	Principais resultados
<p><b>Estados Unidos</b> Wosje (2010)</p>	<p>N=325 crianças de ambos os sexos; Coorte</p>	<p><u>Padrões alimentares</u>: método de regressão de classificação reduzida; inquérito dietético: registro alimentar de 3 dias consecutivos, sendo um dia de final de semana (aplicados a cada ano dos 4 anos de acompanhamento, 1997-99)</p> <p><u>FC</u>: sexo, raça, peso, altura, consumo de cálcio e de energia, atividade física e tempo gasto assistindo televisão</p>	<p><u>Massa óssea</u>: massa óssea (g) (corpo inteiro) avaliada pela DXA (idades entre 3 e 7 anos)</p>	<p>Foram identificados 2 padrões alimentares: <u>padrão 1</u> (caracterizado pelo elevado consumo de grãos não integrais, queijo, carne processada, ovo, batata frita e bebidas açucaradas artificiais); <u>padrão 2</u> (elevado consumo de vegetais verdes escuros, vegetais amarelos e carne processada)</p> <p>Crianças com maiores escores de ambos os padrões tiveram maior massa óssea nos 4 anos do estudo, exceto no ano 4 para o padrão 2, onde a associação foi inversa</p>
<p><b>Canadá</b> Langsetmo (2011)</p>	<p>N=5.188 indivíduos de ambos os sexos; Coorte</p>	<p><u>Padrões alimentares</u>: obtidos por análise fatorial; inquérito dietético: questionário de frequência alimentar (referente ao 2º ano de acompanhamento)</p> <p><u>FC</u>: idade, escolaridade, tabagismo, consumo de bebida alcoólica, atividade física, consumo diário de leite, consumo diário de suplementos (cálcio e vitamina D), diagnóstico de osteoporose, história de fratura de baixo trauma após os 40 anos, presença de comorbidades</p>	<p><u>Massa óssea</u>: fraturas de baixo trauma obtidas por relato do entrevistado (que ocorreram antes do 10º ano de acompanhamento, 2005-07) (idade ≥50 anos)</p>	<p>O padrão “denso em nutrientes” (elevado consumo de frutas, vegetais e grãos integrais) foi associado com menor risco para fraturas entre os mulheres (OR: 0,86; IC95% 0,76; 0,98), sendo uma tendência semelhante observada entre os homens (OR: 0,83; IC95% 0,64; 1,08)</p> <p>Sem associação entre fraturas e o padrão “denso em energia” (elevado consumo de refrigerante, batata frita, hambúrguer, cachorro quente, bacon, linguiça, bolo, chocolate e sorvete)</p>

País Autor (ano)	Amostra Delineamento	Exposição (idade na exposição*) Fatores de confusão (FC)	Desfecho (idade no desfecho)	Principais resultados
<p><b>Austrália</b> McNaughton (2011)</p>	<p>N=683 voluntárias; Transversal</p>	<p><u>Padrões alimentares</u>: obtidos por análise fatorial (análise de componentes principais); inquérito dietético: registro alimentar de 4 dias consecutivos</p> <p><u>FC</u>: idade, altura, consumo energético, consumo de cálcio, atividade física, tabagismo e nível educacional</p>	<p><u>Massa óssea</u>: CMO (corpo inteiro) e DMO (coluna lombar e quadril) obtidos pela DXA (idades entre 18 e 65 anos)</p>	<p>Foram identificados 5 padrões alimentares</p> <p>Relação inversa entre o padrão 1 (elevado consumo de cereais refinados, refrigerante, batata frita, carnes processadas, óleos vegetais, cerveja, e baixo consumo de produtos a base de soja, frutas, vegetais, pão integral e cereal matinal) e CMO (corpo inteiro)</p> <p>Associação positiva entre o padrão 4 (alto consumo de leguminosas, frutos do mar, sementes, nozes, vinho, arroz, vegetais, e baixo consumo de bacon e presunto) e DMO (quadril e coluna lombar) e CMO (corpo inteiro)</p>
<p><b>Coréia</b> Noh (2011)</p>	<p>N=198 meninas; Coorte</p>	<p><u>Padrões alimentares</u>: método de regressão de classificação reduzida; inquérito dietético: 1 recordatório de 24 horas e registro alimentar de 2 dias consecutivos (coletados nos 3 pontos do estudo: <i>baseline</i> e 2 acompanhamentos)</p> <p><u>FC</u>: idade, IMC, gordura corporal, CMO e DMO (referentes ao <i>baseline</i>), maturação sexual e consumo de energia</p>	<p><u>Massa óssea</u>: CMO e DMO (corpo inteiro) obtidas pela DXA (idades entre 9 e 11 anos)</p>	<p>Foram identificados 2 padrões alimentares</p> <p>Meninas com maior escore do padrão “ovos e arroz” (elevado consumo de arroz e ovos, e baixo consumo de nozes, sementes, carnes processadas, batata e grão orientais) tiveram pequeno incremento no CMO, comparado àquelas com menor escore</p> <p>Meninas com maior escore do padrão “frutas, nozes, leite, bebidas, ovos e grãos” (elevado consumo de frutas, nozes, lácteos, ovos e grãos, e baixo consumo de legumes e cogumelos) tiveram maiores incrementos no CMO, em comparação às com menor escore</p>

País Autor (ano)	Amostra Delineamento	Exposição (idade na exposição*) Fatores de confusão (FC)	Desfecho (idade no desfecho)	Principais resultados
<p><b>Irlanda</b> Whittle (2012)</p>	<p>N=489 adultos jovens de ambos os sexos; Transversal</p>	<p><u>Padrões alimentares</u>: obtidos por análise de componentes principais; inquérito dietético: história dietética de 7 dias</p> <p><u>FC</u>: idade, IMC, tabagismo, atividade física, nível socioeconômico e consumo de energia</p>	<p><u>Massa óssea</u>: CMO e DMO (coluna lombar e colo do fêmur) obtidos pela DXA (idades entre 20 e 25 anos)</p>	<p>Foram identificados 4 padrões alimentares para homens (“saudável”, “tradicional”, “refinado” e “social”) e 4 para as mulheres (“saudável”, “tradicional”, “castanhas e carne” e “social”)</p> <p><u>Homens</u>: maior adesão ao padrão “refinado” (elevado consumo de pudim, batata frita, chips, doces confeitados, chocolate e refrigerante) foi associada com menor CMO (colo do fêmur); maior adesão ao padrão “social” (elevado consumo de bebidas alcoólicas) foi associada com maior CMO (colo do fêmur)</p> <p><u>Mulheres</u>: maior adesão ao padrão “nozes e carne” (elevado consumo de nozes, chocolate, carne vermelha, preparações a base de carne e aves) foi associado com maior DMO (colo do fêmur) e maior CMO (colo do fêmur)</p>

\* Somente para estudos com delineamento longitudinal.

### 3. JUSTIFICATIVA

A osteoporose é um problema de saúde pública, que se caracteriza por baixos valores de DMO, resultando no aumento do risco de fraturas. A incidência da doença em idades avançadas pode ser reduzida através da maximização do pico de massa óssea que, dependendo do sítio anatômico do esqueleto, ocorre entre o final da adolescência e início da idade adulta (Prynne, Ginty et al. 2004).

Sabe-se que o desenvolvimento da osteoporose é gradativo e resulta da interação de fatores que ocorrem ao longo das distintas fases do ciclo vital: do período intrauterino até a senilidade. Dentre os determinantes do CMO e/ou DMO, bem como da osteoporose, a dieta tem papel importante em todas as idades.

O efeito da dieta no primeiro ano de vida, sobretudo da amamentação, tem sido objeto de poucos estudos e os resultados são controversos. Quanto aos efeitos da alimentação habitual sobre as medidas de massa óssea, o foco dos estudos tem sido o consumo de nutrientes e/ou alimentos específicos, sendo os padrões alimentares pouco explorados. Estudos acerca dos efeitos destas exposições sobre a massa mineral óssea de adolescentes são escassos.

Frente aos aspectos supracitados, a investigação proposta busca contribuir na produção do conhecimento ao avaliar os efeitos da amamentação e dos padrões alimentares sobre medidas de massa óssea de jovens com 18 anos de idade, pertencentes à coorte de nascimentos de 1993. Dados de acompanhamentos anteriores desta coorte permitem que se avalie o efeito da dieta no primeiro ano de vida, bem como o efeito da alimentação habitual. A partir de dados do último acompanhamento também será possível avaliar medidas de massa óssea entre adolescentes.

#### 4. MODELO TEÓRICO

O modelo teórico conceitual está apresentado na Figura 3.

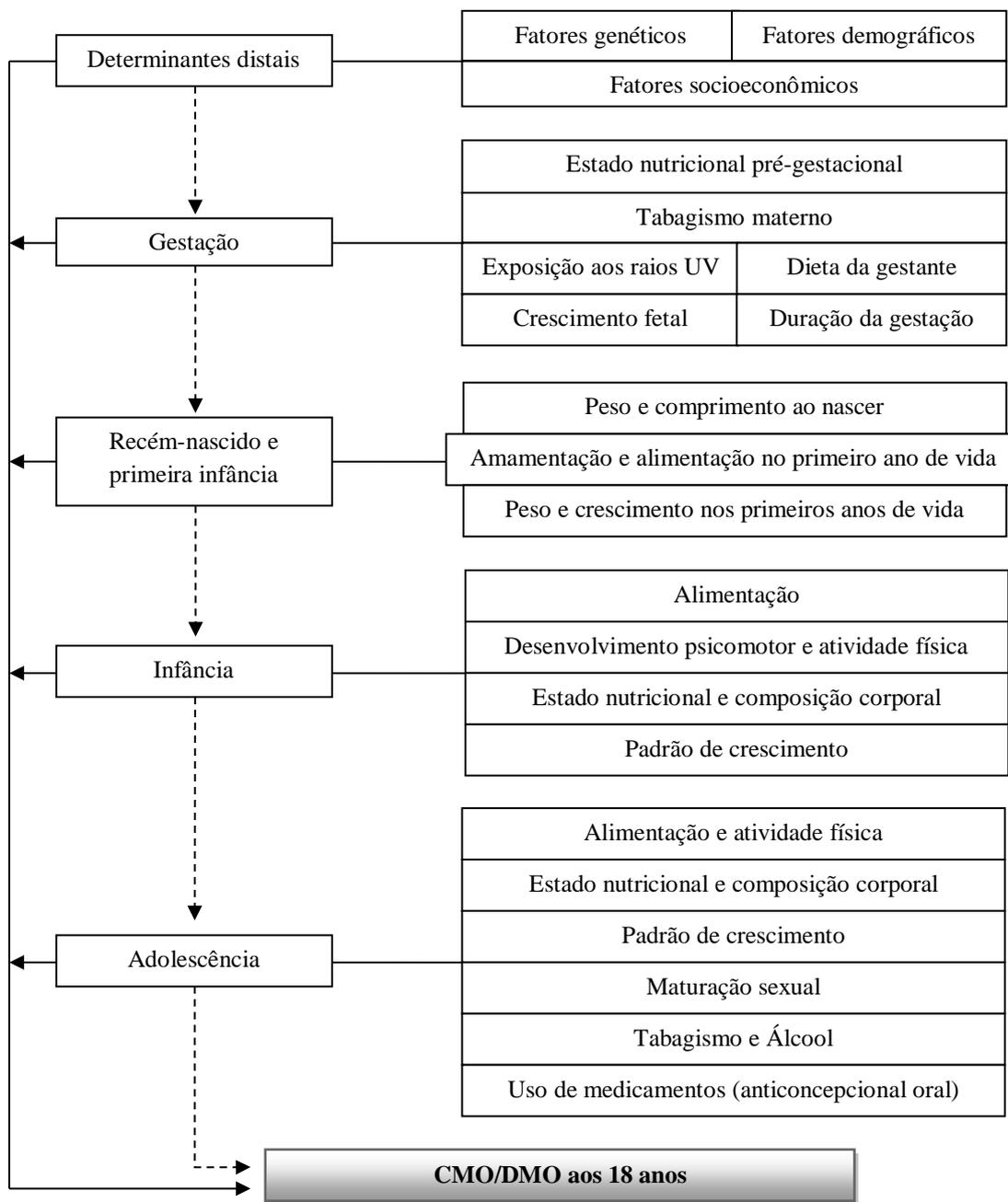


Figura 3. Modelo conceitual de determinação hierárquica do CMO/DMO aos 18 anos de idade. Os níveis superiores determinam aqueles inferiores, seja passando por toda a cadeia (setas tracejadas), ou de forma indireta (graficamente representado pelas setas cheias).

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo geral**

Avaliar o CMO e a DMO do corpo inteiro, coluna lombar e colo do fêmur aos 18 anos de idade e sua relação com amamentação e padrões alimentares durante a adolescência.

### **5.2 Objetivos específicos**

- Descrever o CMO e a DMO dos sítios avaliados aos 18 anos de idade segundo variáveis demográficas e socioeconômicas;
- Avaliar o efeito da duração da amamentação (exclusiva, predominante e total) sobre o CMO e a DMO dos sítios avaliados aos 18 anos de idade;
- Avaliar o efeito da trajetória dos padrões alimentares dos 15 aos 18 anos sobre o CMO e a DMO dos sítios avaliados aos 18 anos de idade.

## **6. HIPÓTESES**

Maiores valores de CMO e DMO aos 18 anos de idade serão observados entre:

- Adolescentes do sexo masculino e de cor da pele não branca;
- Jovens que foram amamentados, comparados aos não amamentados;

- Jovens com maior tempo de amamentação exclusiva e/ou total;
- Adolescentes com maior adesão a padrões alimentares caracterizados por elevado consumo de FLV e de lácteos aos 15 e 18 anos de idade.

## **7. METODOLOGIA**

### 7.1 Delineamento

Estudo de coorte de nascimentos prospectivo, de base populacional, cujo último acompanhamento ocorreu no biênio 2011-12.

Todos os recém-nascidos vivos durante o ano de 1993, cujas mães residiam na zona urbana do município de Pelotas-RS, foram considerados elegíveis para o estudo. Visitas diárias às cinco maternidades hospitalares da cidade foram realizadas entre 01 de janeiro e 31 de dezembro daquele ano. Foram elegíveis para o estudo 5.265 crianças nascidas vivas, dentre as quais 16 mães recusaram participar do estudo (0,3% de recusas). Dessa forma, a coorte original foi composta por 5.249 participantes.

A partir daí, diversos acompanhamentos foram realizados permitindo, assim, estudar a saúde dessas crianças sob diversos aspectos. Alguns acompanhamentos foram feitos com sub-amostras com um, três e seis meses, um e quatro anos de idade. Em 2004-05 buscou-se novamente localizar e entrevistar todos os adolescentes da coorte original. A Figura 4 apresenta os acompanhamentos realizados, com os respectivos processos de amostragem, número de crianças elegíveis e taxas de acompanhamento.

Maiores detalhes sobre os acompanhamentos já realizados na Coorte de Nascimentos de 1993 de Pelotas podem ser obtidos em publicação metodológica específica (Victora, Hallal et al. 2008).

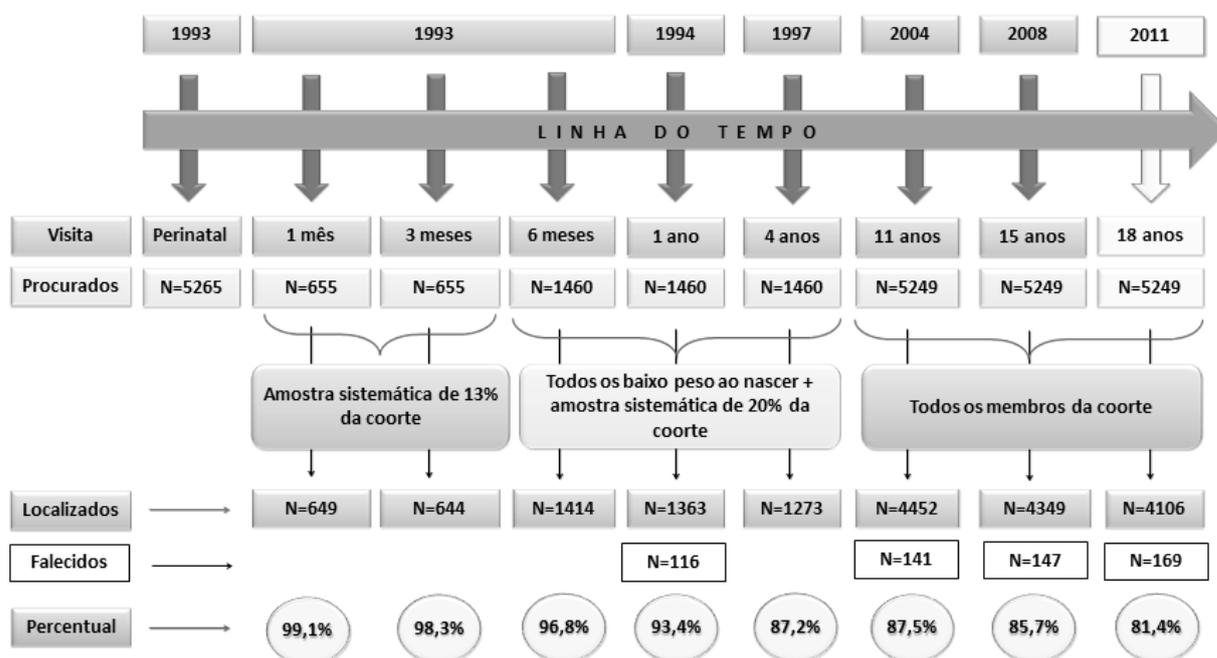


Figura 4. Resumo dos acompanhamentos da coorte de nascimentos de 1993.

## 7.2 População em estudo

Todos os 5.249 nascidos vivos em 1993 residentes na zona urbana do município de Pelotas.

### 7.3 Critérios de inclusão

Serão incluídos no estudo os adolescentes pertencentes à coorte de nascimentos de 1993, que foram acompanhados no primeiro ano de vida (aos seis e 12 meses) e aos 15 e 18 anos de idade.

### 7.4 Critérios de exclusão

Serão excluídos do estudo os participantes com as seguintes características no acompanhamento dos 18 anos (2011-12):

- Grávidas ou jovens com suspeita de estarem grávidas;
- Com próteses metálicas fixas em qualquer parte do corpo (exceto aparelho ortodôntico);
- Que tenham realizado exame radiográfico com contraste nos sete dias anteriores à pesquisa;
- Que estavam em tratamento com suplemento de cálcio nas últimas 24 horas;
- Com limitações motoras permanentes;
- Com impedimento de realizar o exame com DXA devido à dimensão corporal (indivíduos muito altos e/ou muito gordos).

## 7.5 Tamanho da amostra e poder

Tendo em vista que as exposições de interesse para este estudo foram coletadas em acompanhamentos anteriores, realizou-se um cálculo a fim de saber quais as diferenças de médias para CMO e DMO que o estudo seria capaz de detectar, com um erro alfa de 5% e poder de 80%. Para tanto, foram utilizados valores de desvio-padrão (DP) encontrados na literatura para CMO e DMO do corpo inteiro, entre jovens de ambos os sexos com 17 anos de idade (valores de DP para homens: CMO=332 g e DMO=0,09 g/cm<sup>2</sup>; e para mulheres: CMO=337 g e DMO=0,08 g/cm<sup>2</sup>) (Molgaard, Larnkjaer et al. 2011). Para cada categoria das variáveis de exposição, foram usadas as reais proporções que existem no banco de dados da coorte de 1993. Os resultados desses cálculos, estratificado por sexo, são apresentados no Quadro 4.

Quadro 4. Cálculo das mínimas diferenças detectáveis de CMO (g) e DMO (g/cm<sup>2</sup>), segundo algumas das principais exposições. Coorte de nascimentos de 1993.

Variáveis	Mínimas diferenças detectáveis					
	Homens			Mulheres		
	N	CMO DP (332)	DMO DP (0,09)	N	CMO DP (337)	DMO DP (0,08)
<b>Mamou no peito*</b>						
Não	43			48		
Sim	638	146,6	0,0398	685	141,0	0,0335
<b>Mama no peito*</b>						
Não	471			467		
Sim	210	77,2	0,0210	266	72,6	0,0173
<b>Padrão FLV**</b>						
Não	1683			1766		
Sim***	424	50,6	0,0138	444	50,2	0,0134
<b>Padrão Lácteos**</b>						
Não	1673			1776		
Sim***	434	50,2	0,0136	434	50,6	0,0136
<b>Padrão Comum brasileiro**</b>						
Não	1643			1806		
Sim***	464	48,9	0,0133	404	52,0	0,0124
<b>Padrão Doces e salgados**</b>						
Não	1748			1701		
Sim***	359	53,9	0,0147	509	47,7	0,0114
<b>Padrão Proteínas**</b>						
Não	1657			1792		
Sim***	450	49,5	0,0135	418	51,3	0,0122

\* Visita dos seis meses (N=1.414)

\*\* Visita dos 15 anos (N=4.317)

\*\*\* Maior adesão ao padrão alimentar (adolescentes pertencentes ao quinto quintil)

## 7.6 Instrumentos

Todos os questionários referentes aos distintos acompanhamentos da coorte de nascimentos de 1993 estão disponíveis no endereço eletrônico <[www.epidemiio-ufpel.org.br](http://www.epidemiio-ufpel.org.br)>.

### 7.6.1 Instrumento para coleta do desfecho

Para a avaliação das medidas de massa mineral óssea (aos 18 anos de idade) foi utilizado um equipamento de DXA da marca Lunar GE. Durante o exame, os jovens deveriam vestir roupas adequadas (oferecidas pela equipe do estudo), como *top* e bermuda confeccionados em elastano de média compressão.

As medidas foram avaliadas em três sítios: corpo inteiro, coluna lombar e colo do fêmur, conforme procedimentos a seguir:

#### - Avaliação do corpo inteiro (Figura 5)

- Posicionamento do jovem no centro da mesa, utilizando a linha central do equipamento como referência;
- Mãos viradas para o lado, com os polegares para cima, palmas direcionadas para as pernas e braços esticados ao longo do corpo;
- Uso de faixas de velcro ao nível dos joelhos e tornozelos.

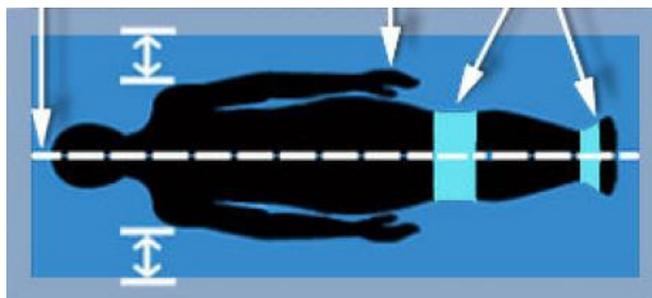


Figura 5. Posicionamento na avaliação da massa mineral óssea do corpo inteiro.

- Avaliação da coluna lombar (Figuras 6 e 7)

- Reposicionamento do braço do aparelho;
- Retirada das fitas de velcro dos joelhos e tornozelos;
- Posicionamento do bloco de espuma sob as pernas (Figura 6) e mãos sobre o peito (Figura 7);
- O feixe de luz incidirá abaixo da cicatriz umbilical (Figura 7) ocorrendo avaliação das vértebras lombares L1 a L4.

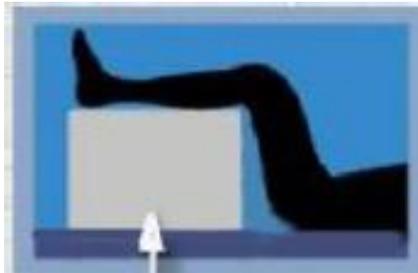


Figura 6. Posicionamento das pernas na avaliação da massa mineral óssea da coluna lombar.

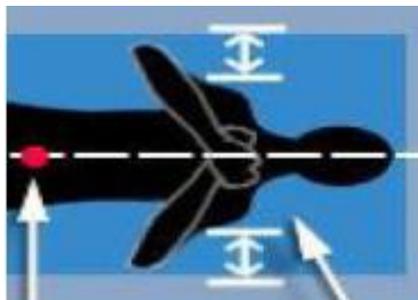


Figura 7. Posicionamento das mãos na avaliação da massa mineral óssea da coluna lombar.

- Avaliação do colo do fêmur (Figura 8)

- Retirada do bloco de espuma e posicionamento do jovem com o aditamento de mensuração do fêmur (Figura 8);
- Utilização das teclas de posicionamento do aparelho de modo a coincidir o ponto vermelho acima da coxa esquerda, ao nível de uma linha que passa abaixo do púbis (Figura 8);
- Avaliação do fêmur direito automaticamente pelo aparelho, após a tomada de medida do fêmur esquerdo.



Figura 8. Posicionamento na avaliação da massa mineral óssea do colo do fêmur.

#### 7.6.2 Instrumentos para coleta das exposições principais

Os dados sobre amamentação foram coletados através de questionários aplicados às mães durante as visitas de um, três, seis e 12 meses de idade. No presente estudo, serão utilizadas as informações coletadas aos seis e 12 meses. A seção do questionário sobre amamentação referente a esses dois acompanhamentos encontra-se no Anexo 1.

A coleta das informações sobre consumo alimentar, utilizadas para a construção dos padrões alimentares, foi realizada a partir de um QFA aplicado aos jovens aos 15 e 18 anos de idade. Na visita dos 15 anos, o QFA (Anexo 2) possuía 81 itens alimentares e era do tipo qualitativo, uma vez que questionava apenas sobre a frequência de consumo de cada alimento. O mesmo era aplicado aos jovens por entrevistadora treinada.

O instrumento utilizado no acompanhamento dos 18 anos era composto por 88 alimentos, sendo do tipo quantitativo, pois investigava além da frequência de consumo a quantidade consumida nos últimos 12 meses. Esse questionário foi autoaplicado em formato digital (Anexo 3). O layout do questionário pode ser observado na Figura 9.

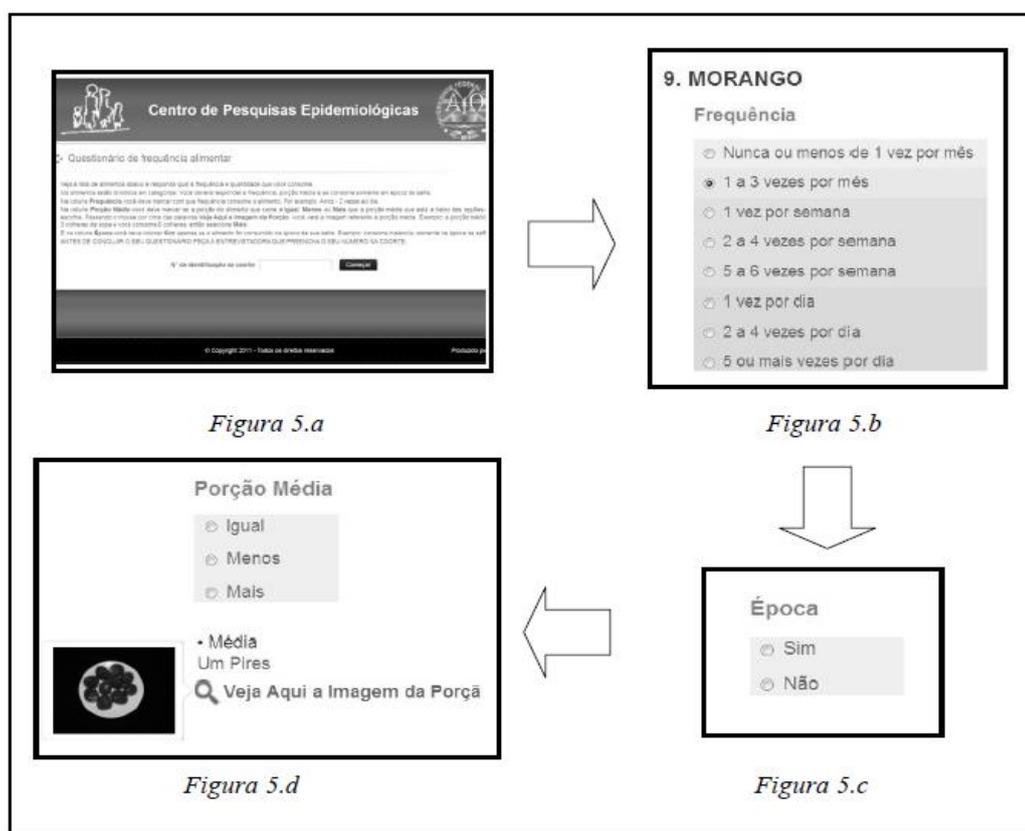


Figura 9. Layout do QFA digital auto-administrado; a) página inicial do questionário com informações sobre o preenchimento; b) frequência de consumo; c) época de consumo (aparecia somente para alguns alimentos); d) tamanho da porção.

## 7.7 Principais variáveis

### 7.7.1 Variáveis dependentes

- CMO (g) do corpo inteiro, coluna lombar e colo do fêmur;
- DMO ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) do corpo inteiro (excluindo a cabeça), coluna lombar e colo do fêmur.

Todas as medidas serão coletadas e analisadas de forma contínua, segundo o valor obtido pelo *software* do equipamento de DXA.

### 7.7.2 Variáveis independentes

As principais variáveis de exposição alimentares, precoces e contemporâneas, incluirão dados de acompanhamentos do primeiro ano de vida (seis e 12 meses) e dos 15 e 18 anos de idade, e são operacionalmente descritas a seguir.

#### 7.7.2.1 Exposições alimentares precoces: amamentação

- Amamentação: será avaliada de forma dicotômica (sim ou não). Com esta variável deseja-se saber se a criança foi amamentada, independente do tipo de aleitamento materno e da duração;

- Duração do aleitamento materno exclusivo (AME): será considerada em AME a criança que recebeu leite materno, diretamente da mama ou extraído, e nenhum outro líquido ou sólido, com exceção de gotas ou xarope de vitaminas e/ou medicamentos;
- Duração do aleitamento materno predominante (AMP): será considerado em AMP o lactente que recebeu, além do leite materno, água ou bebidas a base de água, como sucos de frutas e chás;
- Duração do aleitamento materno (AM): será considerada em AM a criança que recebeu leite materno, diretamente do seio ou extraído, independente de estar recebendo qualquer alimento ou líquido, incluindo leite não humano.

As variáveis duração do AME, AMP e AM serão avaliadas de forma contínua.

#### 7.7.2.2 Exposições alimentares contemporâneas: trajetória de padrões alimentares (15-18 anos)

Os padrões alimentares serão gerados por análise de componentes principais. Para a construção dos padrões alimentares, os alimentos contidos no QFA (dos 18 anos) serão uniformizados em frequência diária de consumo, a fim de obter-se uma unidade única de tempo. Posteriormente, os alimentos serão agrupados considerando os seguintes critérios, por ordem de acontecimento: função, composição nutricional, níveis de consumo e correlação entre estes. Salienta-se que para o agrupamento dos alimentos será levada em consideração a contribuição dos itens alimentares para o equilíbrio ácido-base do organismo, a fim de se identificar um padrão que melhor explique a variabilidade das medidas de massa óssea.

Serão considerados contribuintes como carga para o componente, todos os itens alimentares que apresentarem coeficiente de correlação absoluta igual ou maior a 0,30.

Uma vez que os padrões alimentares já foram definidos aos 15 anos de idade (comum brasileiro, frutas, lácteos, proteínas e glicoseimas), será realizada a análise da trajetória dos padrões alimentares entre 15 e 18 anos. Essa análise consistirá na divisão do escore dos padrões alimentares de ambos os acompanhamentos em quintis. Cada padrão será posteriormente dicotomizado, comparando-se os três primeiros quintis versus o quinto quintil, sendo que este último representará a maior adesão ao padrão alimentar. Com as variáveis dicotômicas será verificada a proporção de jovens que mantiveram (tracking) ou modificaram sua posição dos 15 aos 18 anos de idade.

### 7.7.3 Potenciais mediadores e/ou fatores de confusão

O Quadro 5 apresenta a descrição dos potenciais mediadores e/ou fatores de confusão que serão utilizados nas análises dos artigos que compõem este projeto. Estas variáveis foram coletadas nos diferentes acompanhamentos da coorte de 1993.

Quadro 5. Descrição dos potenciais mediadores e/ou fatores de confusão que serão utilizados nas análises dos artigos originais deste projeto.

<b>Variáveis</b>	<b>Definição/Acompanhamento</b>	<b>Tipo</b>
Sexo ao nascer	Sexo do recém-nascido (perinatal)	Catégorica nominal (masculino; feminino)
Idade materna	Idade da mãe em anos completos (perinatal)	Numérica discreta
Escolaridade materna	Escolaridade da mãe em anos completos de estudo (perinatal)	Numérica discreta
Renda familiar	Em salários mínimos (perinatal)	Catégorica ordinal (em quintis)
Fumo materno na gestação	Se a mãe costumava fumar na gestação (perinatal)	Catégorica nominal (não; sim)
Idade gestacional	Semanas de gestação segundo Dubowitz (perinatal)	Contínua
Peso ao nascer	Em gramas (perinatal)	Contínua
Escore z estatura/idade e peso/estatura	Segundo curvas da OMS (6 meses, 1, 4, 11, 15 e 18 anos)	Contínua
Nível socioeconômico	Pelo índice de bens (15 e 18 anos)	Catégorica ordinal (em quintis)
Cor da pele	Autorreferida (15 anos)	Catégorica nominal (branca; não branca)
Fumo do adolescente	Uso diário de cigarro no mês anterior a entrevista (15 e 18 anos)	Catégorica nominal (não; sim)
Consumo de álcool pelo adolescente	Consumo de álcool no mês anterior a entrevista (15 e 18 anos)	Catégorica nominal (não; sim)
Nível de atividade física	Minutos por semana no lazer (15 e 18 anos)	Contínua
Idade da menarca	Em anos completos (15 e 18 anos)	Numérica discreta
Altura do adolescente	Em centímetros (18 anos)	Contínua
Peso do adolescente	Em centímetros (18 anos)	Contínua
IMC do adolescente	Segundo curvas da OMS (18 anos)	Contínua
Gordura corporal	Em quilogramas (18 anos)	Contínua
Massa livre de gordura	Em quilogramas (18 anos)	Contínua
Paridade da adolescente	Número de filhos (18 anos)	Numérica discreta
Tempo que amamentou os filhos	Em meses (18 anos)	Numérica discreta
Tempo de uso de anticoncepcional oral	Em meses (18 anos)	Numérica discreta
Consumo de cálcio proveniente da dieta	Em miligramas/dia (18 anos)	Contínua

## 7.8 Seleção e treinamento dos entrevistadores

Entrevistadores com nível médio completo foram selecionados e treinados para aplicação dos questionários e realização dos exames de composição corporal. Após o treinamento, os entrevistadores selecionados participaram de um estudo piloto, com duração de uma semana, para acertos finais da logística do estudo.

## 7.9 Logística e coleta dos dados

Os endereços dos participantes da coorte de 1993 vinham sendo atualizados desde o final do acompanhamento de 2008, através de contato telefônico e da internet. Durante o alistamento militar, entre janeiro e abril de 2011, todos os cadastros da junta militar foram avaliados com o objetivo de identificar membros da coorte do sexo masculino e atualizar os seus endereços. A partir de agosto de 2011, com base nos dados cadastrais atualizados, foram geradas listas mensais de entrevistas e os adolescentes foram contatados através de ligações telefônicas, sendo convidados a visitar a clínica localizada nas instalações do Programa em Pós-Graduação em Epidemiologia da UFPel (PPGE/UFPel) para realização da entrevista e avaliação da composição corporal.

Durante a visita à clínica, todos os adolescentes responderam a um questionário, o qual era aplicado com auxílio de um *Personal Digital Assistant* (PDA), através do qual foram coletadas informações sobre nível socioeconômico, histórico escolar, eventos estressores, amizade, religião, qualidade de vida, emprego, composição familiar, uso de serviços de saúde, acidentes, atividade física no lazer e no deslocamento, saúde mental, morbidade ocupacional, lazer, consumo alimentar, morbidade, internações hospitalares e fumo. Um questionário

confidencial impresso foi aplicado abordando questões sobre uso de drogas, violência e sexualidade. Além dos exames de composição corporal, os adolescentes realizaram outros exames, como espirometria, coleta de sangue e ultrassonografia de carótida.

Os adolescentes que recusaram comparecer à clínica e aqueles que não se conseguiu contato através de ligação telefônica, responderam o questionário principal no domicílio e foram convidados a comparecer à clínica para realizar a avaliação antropométrica e da composição corporal.

Todos os membros da coorte participantes do estudo receberam uma ajuda de custo para cobrir os gastos com o seu deslocamento até a clínica, assim como um lanche ao final dos exames.

#### 7.10 Estudo piloto

O estudo piloto foi realizado com indivíduos com idade próxima a 18 anos ( $\pm 2$  anos) que não pertenciam à coorte de Pelotas de 1993, a fim de testar os instrumentos e o fluxo do jovem na clínica.

### **8. SUPERVISÃO E CONTROLE DE QUALIDADE**

Durante o acompanhamento dos 18 anos os integrantes da coorte de 1993 receberam um crachá que continha os nomes de todos os testes e procedimentos a serem realizados, a fim de se controlar o fluxo das entrevistas e dos exames. Este fluxo foi acompanhado por supervisores do trabalho de campo durante toda a coleta de dados, a qual foi realizada por

entrevistadoras previamente treinadas. Todos os equipamentos utilizados obedeceram aos critérios de calibração recomendados pelos fabricantes. Além disso, uma versão reduzida do questionário geral foi reaplicada a 10% da amostra, através de ligação telefônica, para verificar a confiabilidade das respostas.

## **9. PROCESSAMENTO DOS DADOS**

Os dados gerados pelos questionários através do PDA, software do QFA e aparelhos de composição corporal eram transferidos eletronicamente para as bases de dados. Dados de questionários impressos foram digitados. Após esse processo, os bancos de dados foram reunidos e transformados para as análises no programa *Stata 12.0*.

## **10. ANÁLISE DOS DADOS**

Todas as análises serão estratificadas por sexo e realizadas no programa estatístico *Stata 12.0*.

Inicialmente, será realizada análise exploratória dos dados, a fim de verificar a normalidade dos desfechos (a partir de histograma de frequências, curtose e coeficiente de variação). Na análise descritiva, serão mostrados valores de médias e desvios-padrão, para as variáveis contínuas, e de proporções para as variáveis categóricas.

Posteriormente, serão realizados cruzamentos entre os desfechos e as diferentes variáveis independentes. Serão utilizados correlação de Pearson para as variáveis contínuas e

teste-t ou ANOVA para as variáveis categóricas, sendo utilizados seus correspondentes não paramétricos quando necessário.

Para avaliar o efeito das principais exposições (duração da amamentação e padrões alimentares) sobre os desfechos, análises brutas e ajustadas serão realizadas por regressão linear simples e múltipla, respectivamente.

As análises que utilizarem as variáveis de amamentação, referentes às visitas dos seis e 12 meses de idade, serão realizadas com ponderação, uma vez que estes acompanhamentos foram realizados com uma amostra sistemática de 20% da coorte original, mais todos os nascidos com baixo peso.

#### 10.1 Modelo de análise

Os modelos de análise propostos com a finalidade de contemplar os objetivos dos dois artigos originais deste projeto são apresentados nas Figuras 10 e 11.

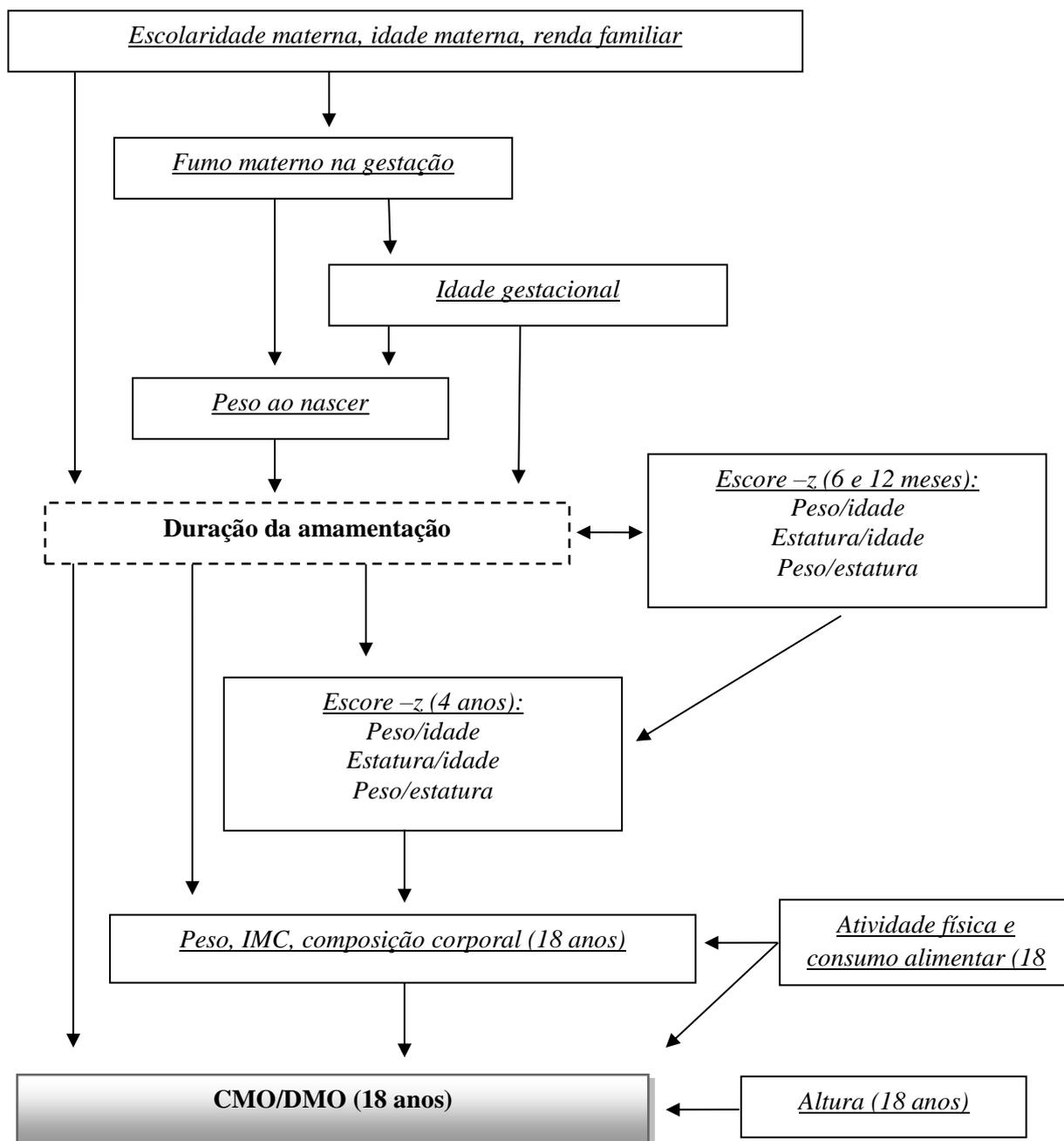


Figura 10. Modelo de análise para o objetivo específico 2 (Artigo 2). As variáveis em itálico sublinhadas são possíveis mediadores ou fatores de confusão. A variável na caixa com linha tracejada é a principal exposição de interesse.

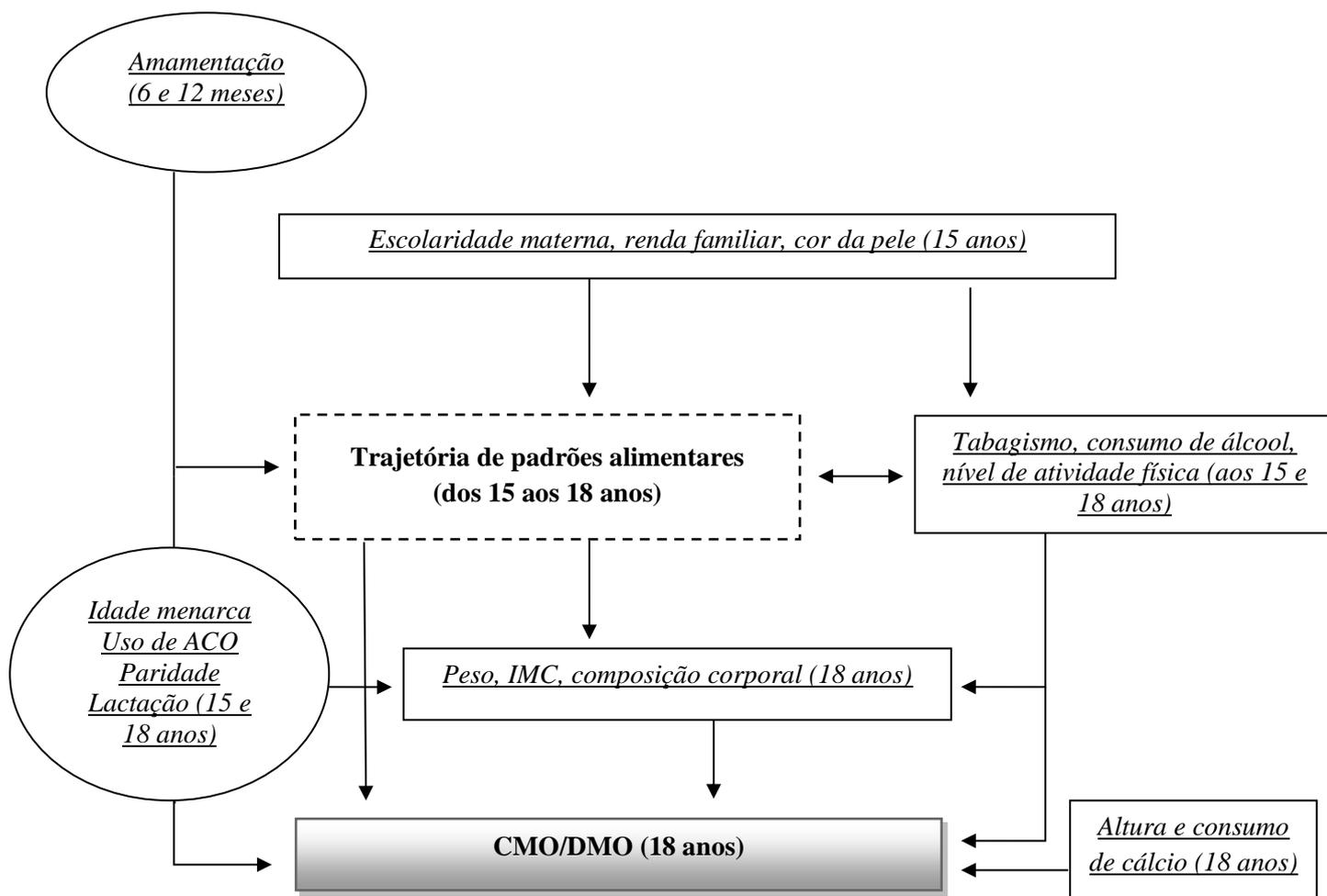


Figura 11. Modelo de análise para o objetivo específico 3 (Artigo 3). As variáveis em itálico sublinhadas são possíveis mediadores ou fatores de confusão. A variável na caixa com linha tracejada é a principal exposição de interesse.

## 11. ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UFPel. Todos os acompanhamentos anteriores da Coorte de 1993 ocorreram sob critérios éticos e tiveram seus projetos submetidos à aprovação do mesmo comitê.

Na visita dos 18 anos, assim como nos acompanhamentos anteriores, foi obtido o consentimento informado por escrito de todos os participantes antes da realização das entrevistas e de qualquer procedimento de medida.

## 12. CRONOGRAMA

Ano Bimestre	2011						2012						2013						2014					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Revisão bibliográfica																								
Elaboração do projeto																								
Estudo piloto																								
Coleta de dados																								
Análise dos dados																								
Redação dos artigos																								
Defesa de tese																								

### **13. DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS**

Os artigos resultantes do presente projeto serão publicados em revistas científicas nacionais e/ou internacionais indexadas. Além disso, será enviado resumo com os principais resultados para divulgação na imprensa local.

### **15. ORÇAMENTO/FINANCIAMENTO**

Este estudo está inserido no Estudo de Coorte de Crianças Nascidas em 1993 na Cidade de Pelotas, RS, o qual é financiado desde 2004 pela Fundação *Wellcome Trust*. Sendo assim, os gastos com este projeto estão incluídos nos orçamentos supracitados e não dependerá de financiamento extra.

### **16. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Allali, F., L. El Mansouri, et al (2009). “The effect of past use of oral contraceptive on bone mineral density, bone biochemical markers and muscle strength in healthy pre and post-menopausal women.” *BMC Womens Health* **9**:31.

Anderson, J. J. (2000). “The important role of physical activity in skeletal development: how exercise may counter low calcium intake.” *Am J Clin Nutr* **71**(6):1384-6.

Andreoli, A., A. Bazzocchi, et al (2011). “Relationship between body composition, body mass index and bone mineral density in a large population of normal, osteopenic and osteoporotic women.” *Radiol Med* **116**(7):1115-23.

Armstrong, D. W. and K. M. Shakir (2000). "Dual X-ray absorptiometry total body bone mineral content and bone mineral density in 18- to 22-year-old caucasian men." Bone **27**(6):835-9.

Avila-Diaz, M., S. Flores-Huerta, et al (2001). "Increments in whole body bone mineral content associated with weight and length in pre-term and full-term infants during the first 6 months of life." Archives of medical research **32**(4):288-92.

Ay, L., V. W. Jaddoe, et al (2011). "Foetal and postnatal growth and bone mass at 6 months: the Generation R Study." Clin Endocrinol (Oxf) **74**(2):181-90.

Bakker, I., J. W. Twisk, et al (2003). "Ten-year longitudinal relationship between physical activity and lumbar bone mass in (young) adults." J Bone Miner Res **18**(2):325-32.

Baroncelli, G. I. and G. Saggese (2000). "Critical ages and stages of puberty in the accumulation of spinal and femoral bone mass: the validity of bone mass measurements." Hormone research **54**(Suppl 1):2-8.

Basu, S., K. Michaelsson, et al (2001). "Association between oxidative stress and bone mineral density." Biochem Biophys Res Commun **288**:275-9.

Bates, C. J. and A. Prentice (1994). Breast milk as a source of vitamins, essential minerals and trace elements." Pharmacol Ther **62**:193-220.

Beck, T. J., T. L. Oreskovic, et al (2001). "Structural adaptation to changing skeletal load in the progression toward hip fragility: the study of osteoporotic fractures." J Bone Miner Res **16**(6):1108-19.

Beltrand, J., M. Alison, et al (2008). "Bone mineral content at birth is determined both by birth weight and fetal growth pattern." Pediatric research **64**(1):86-90. Blake, G. M. and I. Fogelman (1997). "Technical principles of dual energy x-ray absorptiometry." Seminars in nuclear medicine **27**(3):210-28.

Bleicher, K., R. G. Cumming, et al (2011). "Lifestyle factors, medications, and disease influence bone mineral density in older men: findings from the CHAMP study." Osteoporos Int **22**(9):2421-37.

- Boot, A. M., M. A. de Ridder, et al (1997). "Bone mineral density in children and adolescents: relation to puberty, calcium intake, and physical activity." J Clin Endocrinol Metab **82**(1):57-62.
- Bowden, L. S., C. j. Jones, et al (1999). "Bone mineralization in ex-preterm infants aged 8 years." European journal of pediatrics **158**(8):658-61.
- Brandao, C. M., B. M. Camargos, et al (2009). "[2008 official positions of the Brazilian Society for Clinical Densitometry--SBDens]." Arq Bra Endocrinol Metab **53**(1):107-12.
- Bratteb, L. E., G. Samuelson, et al (2002). "Whole-body mineral measurements in Swedish adolescents at 17 years compared to 15 years of age." Acta Paediatr **91**(10):1031-8.
- Chantler, S., K. Dickie, et al (2011). "Site-specific differences in bone mineral density in black and white premenopausal South African women." Osteoporos Int **23**(2):533-42.
- Clark, E. M., A. Ness, et al (2005). "Social position affects bone mass in childhood through opposing actions on height and weight." J Bone Miner Res **20**(12):2082-9.
- Cooper, C., M. Cawley, et al (1995). "Childhood growth, physical activity, and peak bone mass in women." J Bone Miner Res**10**(6):940-7.
- Cooper, C., J. G. Eriksson, et al (2001). "Maternal height, childhood growth and risk of hip fracture in later life: a longitudinal study." Osteoporosis Int **12**:623-629.
- Cooper, C., S. Westlake, et al (2006). "Review: developmental origins of osteoporotic fracture." Osteoporos Int **17**(3):337-47.
- Dalziel, S. R., S. Fenwick, et al (2006). "Peak bone mass after exposure to antenatal betamethasone and prematurity: follow-up of a randomized controlled trial." J Bone Miner Res **21**(8):1175-86.
- Dangelo, J. G. and C. A. Fattini. Anatomia Humana Básica. Rio de Janeiro, 2002.
- De Curtis, M., C. Pieltain, et al (2002). "Body composition in preterm infants fed standard term or enriched formula after hospital discharge. European journal of nutrition." **41**(4):177-82.

- El Hage, R., C. Jacob, et al (2011). "Relative importance of lean mass and fat mass on bone mineral density in a group of Lebanese postmenopausal women." J Clin Densitom **14**(3):326-31.
- Elgan, C., G. Samsioe, et al (2003). "Influence of smoking and oral contraceptives on bone mineral density and bone remodeling in young women: a 2-year study." Contraception **67**(6):439-47.
- Ellis, K. J. (2000). "Human body composition: in vivo methods." Physiological reviews **80**(2):649-80.
- Fauci, A. S., E. Braunwald, et al. Harrison Medicina Interna. Rio de Janeiro, 1998.
- Felson, D. T., Y. Zhang, et al (1995). "Alcohol intake and bone mineral density in elderly men and women. The Framingham Study." Am J Epidemiol **142**(5):485-92.
- Feskanich, D., S. A. Korrnick, et al (1999). "Moderate alcohol consumption and bone density among postmenopausal women." J Womens Health **8**(1):65-73.
- Fewtrell, M. S., A. Prentice, et al (2000). "Effects of growth during infancy and childhood on bone mineralization and turnover in preterm children aged 8-12 years." Acta Paediatr **89**(2):148-53.
- Fewtrell, M. S., J. E. Williams, et al (2009). "Early diet and peak bone mass: 20 year follow-up of a randomized trial of early diet in infants born preterm." Bone **45**(1):142-9.
- Fewtrell, M. (2011). "Early nutritional predictors of long-term bone health in preterm infants." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **14**(3):297-301.
- Fung, T. T., M. J. Stampfer, et al (2004). "Prospective study of major dietary patterns and stroke risk in women." Stroke **35**:2014-2019.
- Ganpule, A., C. S. Yajnik, et al (2006). "Bone mass in Indian children-relationships to maternal nutritional status and diet during pregnancy: the Pune Maternal Nutrition Study." J Clin Endocrinol Metab **91**(8):2994-3001.

- Ganry, O., C. Baudoin, et al (2000). "Effect of alcohol intake on bone mineral density in elderly women: The EPIDOS Study." Am J Epidemiol **151**(8):773-80.
- Gianni, M. L., S. Mora, et al (2008). "Quantitative ultrasound and dual-energy x ray absorptiometry in bone status assessment of ex-preterm infants." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **93**(2):F146-7.
- Godfrey, K., K. Walker-Bone, et al (2001). "Neonatal bone mass: influence of parental birthweight, maternal smoking, body composition, and activity during pregnancy." J Bone Miner Res **16**(9):1694-703.
- Gracia-Marco, L., L. A. Moreno, et al (2011). "Levels of physical activity that predict optimal bone mass in adolescents: the HELENA study." Am J Prev Med **40**(6):599-607.
- Grainge, M. J., C. A. Coupland, et al (1998). "Cigarette smoking, alcohol and caffeine consumption, and bone mineral density in postmenopausal women. The Nottingham EPIC Study Group." Osteoporos Int **8**(4):355-63.
- Harnack, L., J. Stang, et al (1999). "Soft drink consumption among US children and adolescents: Nutritional consequences." J Am Diet Assoc **99**:436-441.
- Harvey, N. C., S. M. Robinson, et al (2009). "Breast-feeding and adherence to infant feeding guidelines do not influence bone mass at age 4 years." Br J Nutr **102**(6):915-20.
- Harvey, N. C., Z. A. Cole, et al (2011). "Physical activity, calcium intake and childhood bone mineral: a population-based cross-sectional study." Osteoporos Int **23**(1):121-30.
- Hartard, M., C. Kleinmond, et al (2007). "Detrimental effect of oral contraceptives on parameters of bone mass and geometry in a cohort of 248 young women." Bone **40**(2):444-50.
- Hasselstrom, H., K. M. Karlsson, et al (2007). "Peripheral bone mineral density and different intensities of physical activity in children 6-8 years old: the Copenhagen School Child Intervention study." Calcified tissue international **80**(1):31-8.
- Heaney, R. P., S. Abrams S, et al (2000). "Peak bone mass." Osteoporos Int **11**(12):985-1009.

Heymsfield, S. B., Z. Wang, et al (1997). "Human body composition: advances in models and methods." Annual review of nutrition **17**:527-58.

Ho-Pham, L. T., N. D. Nguyen, et al (2010). "Contributions of lean mass and fat mass to bone mineral density: a study in postmenopausal women." BMC Musculoskelet Disord **11**:59.

Ilich, J. Z., R. A. Brownbill, et al (2002). "To drink or not to drink: how are alcohol, caffeine and past smoking related to bone mineral density in elderly women?" J Am Coll Nutr **21**(6):536-44.

Javaid, M. K., S. R. Crozier, et al (2006). "Maternal vitamin D status during pregnancy and childhood bone mass at age 9 years: a longitudinal study." Lancet **367**(9504):36-43.

Jensen, R. B., S. Vielwerth, et al (2008). "Fetal growth velocity, size in early life and adolescence, and prediction of bone mass: association to the GH-IGF axis." J Bone Miner Res **23**(3):439-46.

Jones, G., M. D. Riley, et al (2000). "Maternal diet during pregnancy is associated with bone mineral density in children: a longitudinal study." European journal of clinical nutrition **54**(10):749-56.

Jones, G., M. Riley, et al (1999). "Maternal smoking during pregnancy, growth, and bone mass in prepubertal children." J Bone Miner Res **14**(1):146-51.

Jones, G. and T. Dwyer (2000). "Birth weight, birth length, and bone density in prepubertal children: evidence for an association that may be mediated by genetic factors." Calcified tissue international **67**(4):304-8.

Jones, G., M. Riley, et al (2000). "Breastfeeding in early life and bone mass in prepubertal children: a longitudinal study." Osteoporos Int **11**(2):146-52.

Junqueira, L. C. and J. Carneiro. Histologia Básica. Rio de Janeiro, 2004.

Kant, A. K. (2004). "Dietary patterns and health outcomes." J Am Diet Assoc **104**(4):615-635.

- Kontogianni, M. D., L. Melistas, et al (2009). "Association between dietary patterns and indices of bone mass in a sample of Mediterranean women." Nutrition **25**(2):165-71.
- Kuo, C. W., T. H. Chang, et al (2008). "Effect of cigarette smoking on bone mineral density in healthy Taiwanese middle-aged men." J Clin Densitom **11**(4):518-24.
- Langsetmo, L., S. Poliquin, et al (2010). "Dietary patterns in Canadian men and women ages 25 and older: relationship to demographics, body mass index, and bone mineral density." BMC Musculoskelet Disord **11**:20.
- Langsetmo, L., D. A. Hanley, et al (2011). "Dietary patterns and incident low-trauma fractures in postmenopausal women and men aged  $\geq$  50 y: a population-based cohort study." Am J Clin Nutr **93**(1):192-9.
- Lantz, H., L. E. Bratteby, et al (2008). "Body composition in a cohort of Swedish adolescents aged 15, 17 and 20.5 years." Acta Paediatr **97**(12):1691-7.
- Lapillonne, A., B. L. Salle, et al (2004). "Bone mineralization and growth are enhanced in preterm infants fed an isocaloric, nutrient-enriched preterm formula through term." The American journal of clinical nutrition **80**(6):1595-603.
- Liu-Ambrose, T., L. Kravetsky, et al (2006). "Change in lean body mass is a major determinant of change in areal bone mineral density of the proximal femur: a 12-year observational study." Calcified tissue international **79**(3):145-51.
- Lloyd, T., J. R. Buchanan, et al (1989). "Long-term oral contraceptive use does not affect trabecular bone density." Am J Obstet Gynecol **160**(2):402-4.
- Looker, A. C., L. J. Melton, et al (2009). "Age, gender, and race/ethnic differences in total body and subregional bone density." Osteoporos Int **20**(7):1141-9.
- Lorentzon, M., D. Mellstrom, et al (2007). "Smoking is associated with lower bone mineral density and reduced cortical thickness in young men." J Clin Endocrinol Metab **92**(2):497-503.

- Ma, D. Q. and G. Jones (2002). "Clinical risk factors but not bone density are associated with prevalent fractures in prepubertal children." J Paediatr Child Health **38**(5):497-500.
- Marin, R. V., M. A. Pedrosa, et al (2010). "Association between lean mass and handgrip strength with bone mineral density in physically active postmenopausal women." J Clin Densitom **13**(1):96-101.
- Mora, S. and V. Gilsanz (2003). "Establishment of peak bone mass." Endocrinology and metabolism clinics of North America **32**(1):39-63.
- Molgaard, C., A. Larnkjaer, et al (2011). "Are early growth and nutrition related to bone health in adolescence? The Copenhagen Cohort Study of infant nutrition and growth." Am J Clin Nutr **94**(Suppl 6):1865S-9S.
- Massey, L. K. and S. J. Whiting (1993). "Caffeine, urinary calcium, calcium metabolism and bone." J Nutr **123**:1611-1614.
- Mavroei, A., A. D. Stewart et al (2009). "Physical activity and dietary calcium interactions in bone mass in Scottish postmenopausal women." Osteoporos Int **20**(3):409-16.
- Maynard, L. M., S. S. Guo, et al (1998). "Total-body and regional bone mineral content and areal bone mineral density in children aged 8-18 y: the Fels Longitudinal Study." The American journal of clinical nutrition **68**(5):1111-7.
- McNaughton, S. A., N. Wattanapenpaiboon, et al (2011). "An energy-dense, nutrient-poor dietary pattern is inversely associated with bone health in women." J Nutr **141**(8):1516-23.
- McGartland, C., P. J. Robson, et al (2003). "Carbonated soft drink consumption and bone mineral density in adolescence: the Northern Ireland Young Hearts project." J Bone Miner Res **18**(9):1563-9.
- Newby, P. K. and K. L. Tucker (2004). "Empirically derived eating patterns using factor or cluster analysis: a review." Nutr Rev **62**(5):177-203.
- Noh, H. Y., Y. J. Song, et al (2011). "Dietary patterns are associated with physical growth among school girls aged 9-11 years." Nutr Res Pract **5**(6):569-77.

- Okubo, H., S. Sasaki, et al (2006). "Dietary patterns associated with bone mineral density in premenopausal Japanese farmwomen." Am J Clin Nutr **83**(5):1185-92.
- Oliver, H., K. A. Jameson, et al (2007). "Growth in early life predicts bone strength in late adulthood: the Hertfordshire Cohort Study." Bone **41**(3):400-5.
- Ong, K. K., M. A. Preece, et al (2002). "Size at birth and early childhood growth in relation to maternal smoking, parity and infant breast-feeding: Longitudinal birth cohort study and analysis." Pediatr Res **52**:863-7.
- Pikkarainen, E., M. Lehtonen-Veromaa, et al (2008). "Estrogen-progestin contraceptive use during adolescence prevents bone mass acquisition: a 4-year follow-up study." Contraception **78**(3):226-31.
- Pirila, S., M. Taskinen, et al (2011). "Infant milk feeding influences adult bone health: a prospective study from birth to 32 years." PLoS One **6**(4):e19068.
- Prentice, A. (2004). "Diet, nutrition and osteoporosis." Public Health Nutrition **7**:237-254.
- Prentice, A., J. P. Bonjour, et al (2003). "PASSCLAIM – Bone Health and Osteoporosis." European Journal of Nutrition **42**(Suppl 1):I/28-I/49.
- Prentice, A. (2003). "Micronutrients and the bone mineral content of the mother, fetus and newborn." J Nutr **133**(5 Suppl 2):1693S-9S.
- Prentice, A., L. M. Jarjou, et al (1995). "Calcium requirements of lactating Gambian mothers: Effects of a calcium supplement on breast-milk calcium concentration, maternal bone mineral content, and urinary calcium excretion." Am J Clin Nutr **62**:58-67.
- Prior, J. C., S. A. Kirkland, et al (2001). "Oral contraceptive use and bone mineral density in premenopausal women: cross-sectional, population-based data from the Canadian Multicentre Osteoporosis Study." CMAJ **165**(8):1023-9.
- Prynne, C. J., F. Ginty, et al (2004). "Dietary acid-base balance and intake of bone-related nutrients in Cambridge teenagers." Eur J Clin Nutr **58**(11):1462-71.

- Prynne, C. J., G. D. Mishra, et al (2006). "Fruit and vegetable intakes and bone mineral status: a cross sectional study in 5 age and sex cohorts." Am J Clin Nutr **83**(6):1420-8.
- Recker, R. R., K. M. Davies, et al (1992). "Bone gain in young adult women." Jama **268**(17):2403-8.
- Reid, I. R., L. D. Plank, et al (1992). "Fat mass is an important determinant of whole body bone density in premenopausal women but not in men." J Clin Endocrinol Metab **75**(3):779-82.
- Ruffing, J. A., F. Cosman, et al (2006). "Determinants of bone mass and bone size in a large cohort of physically active young adult men." Nutr Metab (Lond) **3**:14.
- Sayers, A. and J. H. Tobias (2009). "Estimated maternal ultraviolet B exposure levels in pregnancy influence skeletal development of the child." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **94**(3):765-71.
- Schluskel, M. M., J. A. Castro, et al (2010). "Birth weight and bone mass in young adults from Brazil." Bone **46**(4):957-63.
- Scholes, D., L. Ichikawa, et al (2010). "Oral contraceptive use and bone density in adolescent and young adult women." Contraception **81**(1):35-40.
- Schonau, E. (2004). "The peak bone mass concept: is it still relevant?" Pediatric nephrology (Berlin, Germany) **19**(8):825-31.
- Shoepe, H. A. and C. M. Snow (2005). "Oral contraceptive use in young women is associated with lower bone mineral density than that of controls." Osteoporos Int **16**:1538-44.
- Steer, D. C. and H. J. Tobias (2011). "Insights into the programming of bone development from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC)." Am J Clin Nutr **94**(Suppl 6):1861S-4S.
- Sterle, L., J. P. Sabatier, et al (2009). "Milk, rather than other foods, is associated with vertebral bone mass and circulating IGF-1 in female adolescents." Osteoporos Int **20**(4):567-75.

- Stevenson, J. C., B. Lees, et al (1989). "Determinants of bone density in normal women: risk factors for future osteoporosis?" BMJ **298**(6678):924-8.
- Teegarden, D., W. R. Proulx, et al (1995). "Peak bone mass in young women." J Bone Miner Res **10**(5):711-5.
- Tobias, J. H., C. D. Steer, et al (2005). "Bone mass in childhood is related to maternal diet in pregnancy." Osteoporos Int **16**(12):1731-41.
- Tucker, K. L., H. Chen, et al (2002). "Bone mineral density and dietary patterns in older adults: the Framingham Osteoporosis Study." Am J Clin Nutr **76**(1):245-52.
- Tylavsky, F. A., K. Holliday, et al (2004). "Fruit and vegetable intakes are an independent predictor of bone size in early pubertal children." Am J Clin Nutr **79**(2):311-7.
- Victora, C. G., P. C. Hallal, et al (2008). "Cohort profile: the 1993 Pelotas (Brazil) birth cohort study." Int J Epidemiol **37**:704-709.
- Vidulich, L., S. A. Norris, et al (2007). "Infant programming of bone size and bone mass in 10-year-old black and white South African children." Paediatric and perinatal epidemiology **21**(4):354-62.
- Viljakainen, H. T., M. Pekkinen, et al (2011). "Dual effect of adipose tissue on bone health during growth." Bone **48**(2):212-7.
- Williams, F. M., L. F. Cherkas, et al (2005). "The effect of moderate alcohol consumption on bone mineral density: a study of female twins." Ann Rheum Dis **64**(2):309-10.
- Whittle, C. R., J. V. Woodside, et al (2012). "Dietary patterns and bone mineral status in young adults: the Northern Ireland Young Hearts Project." Br J Nutr **4**:1-11.
- Wosje, K. S., P. R. Khoury, et al (2010). "Dietary patterns associated with fat and bone mass in young children." Am J Clin Nutr **92**(2):294-303.
- Wosje, K. S. and H. J. Kalkwarf (2007). "Bone density in relation to alcohol intake among men and women in the United States." Osteoporos Int **18**(3):391-400.

Wyshak, G. (2000). "Teenaged girls, carbonated beverage consumption, and bone fractures." Arch Pediatr Adolesc Med **154**:610-613.

Young, R. J., D. L. Antonson, et al (2005). "Neonatal and infant feeding: Effect on bone density at 4 years." Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition **41**(1):88-93.

Zagarins, S. E., A. G. Ronnenberg, et al (2010). "The association of lean mass and fat mass with peak bone mass in young premenopausal women." J Clin Densitom **13**(4):392-8.

Zuccotti, G., A. Vigano, et al (2011). "Longitudinal changes of bone ultrasound measurements in healthy infants during the first year of life: influence of gender and type of feeding." Calcif Tissue Int **89**(4):312-7.

## 17. ANEXOS

### 17.1 Anexo 1: Questões sobre Amamentação (acompanhamento dos seis e 12 meses)

#### Seis meses

*Agora vou lhe fazer algumas perguntas sobre o que <CRIANÇA> está comendo*

- 6 *Ontem <CRIANÇA> se alimentou como sempre?*  
 (1) Sim (VA PARA 8)      (2) Não      (9) IGN
- 7 *SE NÃO: Quando foi o último dia que <CRIANÇA> se alimentou como sempre?*  
 \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ (IGN = 01/01/01, NSA = 02/02/02)
- 8 *Por favor diga-me tudo que <CRIANÇA> comeu neste dia ?*

#### RECORDATÓRIO ALIMENTAR - 24 HORAS

<i>Alimento</i>	<i>Acordar</i>	<i>Manhã</i>	<i>Almoço</i>	<i>Tarde</i>	<i>Janta</i>	<i>Dormir</i>	<i>Madrugada</i>
<i>LM</i>							
<i>L Vaca</i>							
<i>L Pó</i>							
<i>Café</i>							
<i>Água/ chá</i>							
<i>Suco</i>							
<i>Pão/ Bolacha</i>							
<i>Iogurte</i>							
<i>Mingau</i>							
<i>Caldo</i>							
<i>Frutas</i>							

Ovo							
Arroz							
Feijão							
Legume/ verdura							
Massa							
Batata/ Aipim							
Carne							
Outro							
Refeições							

SE A MÃE CITOU LEITE DE VACA OU EM PÓ, PERGUNTAR:

Usou engrassante ? (1) Sim (2) Não (8) NSA (9) IGN

Agora eu vou lhe dizer uma lista de líquidos e alimentos a Sra. vai me dizer se já começou a dar para <CRIANÇA>. Quando eu digo começou eu quero saber se <CRIANÇA> recebe(eu) este líquido ou alimento todos os dias, ou quase todos os dias da semana. Se a Sra. já começou a dar, eu quero saber quando começou:

Leite de saquinho:                    \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

Leite em pó:                            \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

Chá:                                        \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

Suco:                                      \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

Papa de frutas:                        \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

Papa salgada (leg/ver):                \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

Mingau:                                  \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

Iogurte:                                  \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

Pão/bolacha:                            \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

Ovo (gema):                              \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

Ovo (clara):                              \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

Carne:                                     \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

Caldo de feijão:                        \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

Feijão (grão):                          \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

Arroz:                                     \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

Massa:                                     \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

Tem alguma outra comida que ele(a) já recebeu e que eu não falei agora ?

Outro1 \_\_\_\_\_:                    \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

Outro2 \_\_\_\_\_:                    \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

Outro3 \_\_\_\_\_:                    \_\_ meses \_\_ \_\_ dias

(nunca tomou = 8 meses, 88 dias) (ignorado = 9 meses, 99 dias)

SE NO RECORDATÓRIO A MÃE NÃO CITOU LEITE MATERNO, PERGUNTAR, SE JÁ FOI CITADO ASSINALE A OPÇÃO 1 NA PERGUNTA 10 E PULE PARA A QUESTÃO 12.

- 10 <CRIANÇA> chegou a mamar no peito ?  
(1) Sim, ainda mama (3) Nunca mamou  
(2) Sim, já parou - Até que idade mamou ?  
    \_\_ meses \_\_ dias  
(8 88= NSA; 9 99= IGN)

**SE NUNCA MAMOU:**

Porque não chegou a mamar? Razões 1ª \_\_ 2ª \_\_

- (01) Mãe não quis (02) Ele não quis  
(03) Seio sem bico (04) Não tinha leite  
(05) Ele foi adotado (06) Mãe doente  
(07) Prematuro/doente (08) Alguém aconselhou  
(09) Dor, rachadura ou infecção no seio  
( ) Outro: \_\_\_\_\_  
(88) NSA (99) IGN

**SE AINDA MAMA:**

12. Até que idade pretende dar o peito ?  
    \_\_ meses OU outro: \_\_\_\_\_  
(77= enquanto a criança quiser; 78= enquanto tiver leite)  
13. Está tendo alguma dificuldade agora para dar de mamar?  
(1) Sim (2) Não (8) NSA (9) IGN  
14. Se sim: Qual? \_\_\_\_\_  
    \_\_\_\_\_

**15. PREENCHA DE ACORDO COM RECORDATÓRIO ALIMENTAR**

**A <CRIANÇA> RECEBE:**

- (1) Só leite materno  
(2) LM + líquidos  
(3) LM + outro leite + líquidos  
(4) LM + outro leite + outros alimentos sólidos e líquidos  
(5) Só outro leite  
(6) Outro leite + líquidos  
(7) Outro leite + outros alimentos sólidos e líquidos  
( ) Outro: \_\_\_\_\_

Doze meses

6 *Ontem <CRIANÇA> se alimentou como sempre ?*

(1) *Sim (VÁ PARA 7)*      (9) *IGN*

(2) *Não - Quando foi o último dia que <CRIANÇA> se alimentou como sempre?*

*\_\_ / \_\_ / \_\_ (IGN = 01/01/01, NSA = 02/02/02)*

7 *Por favor diga-me tudo que <CRIANÇA> comeu neste dia ?*

<i>Alimento</i>	<i>Acordar</i>	<i>Manhã</i>	<i>Almoço</i>	<i>Tarde</i>	<i>Janta</i>	<i>Dormir</i>	<i>Madrugada</i>
<i>LM</i>							
<i>L Vaca</i>							
<i>L Pó</i>							
<i>Café</i>							
<i>Água/ chá</i>							
<i>Suco</i>							
<i>Pão/ Bolacha</i>							
<i>Iogurte</i>							
<i>Frutas</i>							
<i>Ovo</i>							
<i>Arroz</i>							

Feijão							
Legume/ verdura							
Massa							
Batata/ Aipim							
Carne							
Outro							
Refeições							

8 <CRIANÇA> mama no peito ?

(1) Sim (2) Não - Até que idade mamou ? \_\_\_ meses \_\_\_ dias

SE AINDA MAMA:

10 Até que idade pretende dar o peito ?

\_\_\_ meses OU outro \_\_\_\_\_

(77 = enquanto criança quiser; 78 = enquanto tiver leite)

17.2 Anexo 2: Questionário de frequência alimentar (acompanhamento 15 anos)

<b>AGORA VAMOS FALAR SOBRE ALIMENTAÇÃO. O QUE NOS INTERESSA É SABER COMO TEM SIDO TUA ALIMENTAÇÃO DESDE &lt;MÊS DO ANO PASSADO&gt;. VOU LISTAR OS NOMES DE ALGUNS ALIMENTOS E PEÇO QUE ME DIGAS SE COMESTE ESSES ALIMENTOS E QUANTAS VEZES. POR EXEMPLO: COMESTE ARROZ? QUANTAS VEZES?</b>																
Alimentos	A. Desde <mês do ano passado>, comeste alguma vez?		B. Quantas vezes e com que frequência?													
	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
61. Arroz	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
62. Feijão	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
63. Macarrão	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
64. Farinha de mandioca	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
65. Pão branco	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
66. Pão feito em casa	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
67. Pão integral	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
68. Bolacha doce ou recheada	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
69. Bolacha salgada	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
70. Bolo	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
71. Polenta	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
72. Chips, salgadinhos	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
73. Batata frita ou batata chips	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
74. Batata cozida	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
75. Alpim	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
76. Pipoca	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
77. Lentilha, ervilha, grão de bico	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
78. Alface	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
79. Couve	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
80. Repolho	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
81. Laranja ou bergamota ( )	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
82. Banana	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
83. Mamão ou Papaia	(0) Não	(1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A

Alimentos	A. Desde <mês do ano passado>, comeste alguma vez?	B. Quantas vezes e com que frequência?													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
84. Maçã	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
85. Melancia ou melão ( )	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
86. Abacaxi ( )	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
87. Abacate ( )	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
88. Manga ( )	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
89. Morango ( )	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
90. Uva ( )	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
91. Pêssego ( )	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
92. Goiaba ( )	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
93. Pêra ( )	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A

AGORA VOU TE PERGUNTAR SOBRE MAIS ALGUNS ALIMENTOS.															
Alimentos	A. Desde <mês do ano passado>, alguma vez comeste?	B. Quantas vezes e com que frequência?													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
116. Tomate	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
117. Chuchu	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
118. Abóbora	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
119. Pepino ao natural	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
120. Vagem ( )	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
121. Cenoura	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
122. Beterraba	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
123. Couve-flor	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
124. Ovos	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
125. Leite integral	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
126. Leite desnatado	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
127. Iogurte	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
128. Queijo	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
129. Carne sem osso, tipo bife, carne assada, guisado, etc	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A

<i>Alimentos</i>	<b>A. Desde &lt;mês do ano passado&gt;, alguma vez comeste?</b>	<b>B. Quantas vezes e com que frequência?</b>													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
130. Carne com osso, tipo costela, paleta, agulha, etc	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
131. Carne de porco	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
132. Frango	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
133. Peixe fresco	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
134. Camarão	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
135. Bauru ou Cheesburger	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
136. Presunto ou mortadela	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
137. Salsicha ou lingüiça	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
138. Cachorro quente	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
139. Pizza	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
140. Maionese	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
141. Salgados como quibe, pastel, empada, etc.	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A

**E PARA TERMINAR, GOSTARIA DE TE PERGUNTAR SOBRE MAIS ALGUNS ALIMENTOS.**

<i>Alimentos</i>	<b>A. Desde &lt;mês do ano passado&gt;, alguma vez comeste?</b>	<b>B. Quantas vezes e com que frequência?</b>													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
153. Sorvete/picolé ( )	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
154. Açúcar	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
155. Balas	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A

<i>Alimentos</i>	<b>A. Desde &lt;mês do ano passado&gt;, alguma vez comeste?</b>	<b>B. Quantas vezes e com que frequência?</b>													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
156. Chocolate em pó ou Nescau	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
157. Chocolate em barra ou bombom	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
158. Pudim ou doces	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
159. Refrigerante normal	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
160. Refrigerante light	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
161. Café	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
162. Sucos da fruta ou polpa	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
163. Sucos artificiais	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
164. Cerveja	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
165. Vinho	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
166. Outras bebidas alcoólicas	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
167. Alho	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
168. Cebola	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
169. Visceras como rim, fígado, coração, moela, mondongo	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
170. Peixe enlatado como sardinha, atum	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
171. Carnes conservadas em sal como carne seca, charque, bacalhau	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
172. Alimentos enlatados como ervilha, azeitona, palmito	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
173. Churrasco	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A
174. Chimarrão	(0) Não (1) Sim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A

17.3 Anexo 3: Questionário de frequência alimentar (acompanhamento 18 anos)

ALIMENTO	FREQUÊNCIA								QUANTIDADE				ÉPOCA
<b>CEREAIS E TUBÉRCULOS</b>	Nunca ou <1x/mês	1-3x mês	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	PORÇÃO MÉDIA	Menos	Igual	Mais	
Arroz	<input type="radio"/>	3 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Pão integral ou preto	<input type="radio"/>	3 fatias	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Pão branco	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Pão caseiro	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Macarrão	<input type="radio"/>	1 pegador	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Farinha de mandioca	<input type="radio"/>	2 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Bolacha doce ou recheada	<input type="radio"/>	5 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Bolacha salgada	<input type="radio"/>	5 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Bolo sem recheio	<input type="radio"/>	1 fatia grande	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Batata cozida	<input type="radio"/>	4 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Batata frita	<input type="radio"/>	1 pires	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Polenta frita	<input type="radio"/>	1 pires	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Aipim frito	<input type="radio"/>	1 pires	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Milho na espiga	<input type="radio"/>	2 espigas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
ALIMENTO	FREQUÊNCIA								QUANTIDADE				ÉPOCA
<b>LEITE E DERIVADOS</b>	Nunca ou <1x/mês	1-3x mês	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	PORÇÃO MÉDIA	Menos	Igual	Mais	
Leite	<input type="radio"/>	1 copo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
logurte	<input type="radio"/>	1 copo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Queijo	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								

Requeijão	<input type="radio"/>	1 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
ALIMENTO	FREQÜÊNCIA								QUANTIDADE			ÉPOCA	
<b>FRUTAS, VERDURAS E LEGUMES</b>	Nunca ou <1x/mês	1-3x mês	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	PORÇÃO MÉDIA	Menos	Igual		Mais
Laranja ou bergamota	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Banana	<input type="radio"/>	3 unidades (banana prata)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Mamão	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Maçã	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Melancia ou melão	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>							
Abacaxi	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>							
Abacate	<input type="radio"/>	½ unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>							
Manga	<input type="radio"/>	½ unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>							
Morango	<input type="radio"/>	1 pires	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>							
Uva	<input type="radio"/>	1 cacho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>							
Pêssego	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>							
Goiaba	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>							
Pêra	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>							
Alface	<input type="radio"/>	1 folha	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Tomate	<input type="radio"/>	5 rodela	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Cebola	<input type="radio"/>	2 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Alho	<input type="radio"/>	1 dente	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Couve	<input type="radio"/>	2 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Repolho	<input type="radio"/>	2 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								

Chuchu	<input type="radio"/>	3 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Abóbora	<input type="radio"/>	2 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Pepino ao natural	<input type="radio"/>	5 rodela	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Vagem	<input type="radio"/>	3 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Cenoura	<input type="radio"/>	3 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Beterraba	<input type="radio"/>	2 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Couve-flor	<input type="radio"/>	1 pires	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Pimentão	<input type="radio"/>	1 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
<b>LIMENTO</b>	<b>FREQUÊNCIA</b>								<b>QUANTIDADE</b>				<b>ÉPOCA</b>
<b>LEGUMINOSAS</b>	Nunca ou <1x/mês	1-3x mês	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	<b>PORÇÃO MÉDIA</b>	Menos	Igual	Mais	
Feijão	<input type="radio"/>	1 concha	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Lentilha, ervilha, grão de bico	<input type="radio"/>	1 concha	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
<b>ALIMENTO</b>	<b>FREQUÊNCIA</b>								<b>QUANTIDADE</b>				<b>ÉPOCA</b>
<b>CARNES E OVOS</b>	Nunca ou <1x/mês	1-3x mês	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	<b>PORÇÃO MÉDIA</b>	Menos	Igual	Mais	
Carne com osso tipo costela, paleta, agulha	<input type="radio"/>	1 pedaço grande ou 1 chuleta grande	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Carne vermelha tipo bife ou guisado	<input type="radio"/>	1 pedaço grande ou 2 col sopa (guisado)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Carne de porco	<input type="radio"/>	1 pedaço grande	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Frango assado	<input type="radio"/>	1 sobrecoxa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Frango frito	<input type="radio"/>	2 coxas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Peixe	<input type="radio"/>	1 filé grande	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Camarão	<input type="radio"/>	1 pires	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>							
Peixe enlatado como sardinha e atum	<input type="radio"/>	2 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								

Vísceras (rim/fígado/coração/moela)	<input type="radio"/>	1 bife ou 3 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Salsicha ou linguiça	<input type="radio"/>	1 unidade média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Mortadela, presunto, salame	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Bacon/toucinho	<input type="radio"/>	1 pedaço	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Carnes conservadas em sal como carne seca, charque, bacalhau	<input type="radio"/>	1 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Ovos	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
<b>ALIMENTO</b>	<b>FREQUÊNCIA</b>								<b>QUANTIDADE</b>				<b>ÉPOCA</b>
<b>GORDURAS</b>	Nunca ou <1x/mês	1-3x mês	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	<b>PORÇÃO MÉDIA</b>	Menos	Igual	Mais	
Manteiga	<input type="radio"/>	3 col chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Margarina	<input type="radio"/>	1 col chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Maionese	<input type="radio"/>	1 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
<b>ALIMENTO</b>	<b>FREQUÊNCIA</b>								<b>QUANTIDADE</b>				<b>ÉPOCA</b>
<b>AÇÚCARES E DOCES</b>	Nunca ou <1x/mês	1-3x mês	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	<b>PORÇÃO MÉDIA</b>	Menos	Igual	Mais	
Açúcar	<input type="radio"/>	3 col chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Sorvete e picolé	<input type="radio"/>	2 bolas de sorvete ou 1 picolé	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>							
Balas	<input type="radio"/>	4 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Pudim ou doces	<input type="radio"/>	2 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Chocolate em pó ou Nescau	<input type="radio"/>	2 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Chocolate em barra ou bombom	<input type="radio"/>	1 barra pequena ou 1 bombom	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
<b>ALIMENTO</b>	<b>FREQUÊNCIA</b>								<b>QUANTIDADE</b>				<b>ÉPOCA</b>
<b>BEBIDAS</b>	Nunca ou <1x/mês	1-3x mês	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	<b>PORÇÃO MÉDIA</b>	Menos	Igual	Mais	

Refrigerante normal	<input type="radio"/>	1 copo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Refrigerante light/diet/zero	<input type="radio"/>	1 copo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Suco de caixa ou pó	<input type="radio"/>	1 copo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Suco natural (fruta ou polpa)	<input type="radio"/>	1 copo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Café ou chás	<input type="radio"/>	1 xícara	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Chimarrão	<input type="radio"/>	6 cuias	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Cerveja	<input type="radio"/>	2 latas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Vinho	<input type="radio"/>	1 taça	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Cachaça/uísque/vodka	<input type="radio"/>	1 dose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
<b>ALIMENTO</b>	<b>FREQUÊNCIA</b>								<b>QUANTIDADE</b>				<b>ÉPOCA</b>
<b>OUTROS</b>	Nunca ou <1x/mês	1-3x mês	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	<b>PORÇÃO MÉDIA</b>	Menos	Igual	Mais	
Castanha, noz, amêndoa ou avelã	<input type="radio"/>	3 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Bauru, cheesburger	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Hamburguer ou bife de guisado	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Cachorro quente	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Pizza	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Salgados como quibe, pastel, empada	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Alimentos enlatados	<input type="radio"/>	1 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Pipoca	<input type="radio"/>	2 sacos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								
Chips e salgadinho	<input type="radio"/>	1 pacote	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>								

## **1. Modificações do projeto**

---

## **Modificações ao projeto original**

Conforme aprovado pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia (PPGE), em reunião realizada no mês de julho de 2014, o artigo inicialmente previsto no projeto de pesquisa e indicado como “Artigo 3”, que tinha como objetivo avaliar o efeito da trajetória dos padrões alimentares dos 15 aos 18 anos sobre a massa óssea aos 18 anos de idade, foi substituído.

O manuscrito, agora incorporado à tese como “Artigo 3”, teve como objetivo avaliar a associação do IMC aos 11 anos de idade com a massa óssea de participantes da coorte de nascimentos de 1993, aos 18 anos, bem como avaliar o potencial papel do IMC, MG e MLG aos 18 anos de idade como mediadores desta associação, através de “path analysis”.

A carta submetida ao colegiado do PPGE explicando os motivos para tal substituição encontra-se no final desta seção.

Ainda, o artigo inicialmente previsto no projeto de pesquisa e indicado como “Artigo 2”, que tinha como objetivo avaliar o efeito do aleitamento materno, duração total do aleitamento materno e padrão de amamentação aos três meses de vida sobre a massa óssea aos 18 anos de idade, utilizando, para tanto, dados de uma subamostra da Coorte de Nascimentos de 1993 (C93), incluiu, também, dados da Coorte de Nascimentos de 1982 (C82). A C82, assim como a C93, avaliou a massa óssea dos participantes no último acompanhamento, além de possuir dados sobre amamentação coletados prospectivamente. Tais aspectos possibilitaram a análise conjunta dos dados, conferindo maior robustez aos resultados apresentados no manuscrito.

## Carta submetida ao Colegiado do PPGE

Pelotas, 30 de junho de 2014.

PARA: Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia

DE: Ludmila Correa Muniz

Prezados Professores,

Tendo em vista que este é meu último ano de doutorado, venho por meio desta fazer uma solicitação a este Colegiado. Inicialmente descrevo a situação dos três artigos propostos no projeto de doutorado:

1. O artigo de revisão, intitulado “Efeito da amamentação sobre a massa óssea na infância, adolescência e no adulto jovem: revisão sistemática e metanálise”, encontra-se submetido à revista *Cadernos de Saúde Pública*.
2. O artigo longitudinal, intitulado “Influência da amamentação sobre a massa mineral óssea de adolescentes com 18 anos de idade pertencentes a uma coorte de nascimentos”, encontra-se em fase de finalização (redação da discussão).
3. O terceiro artigo, intitulado “Trajetória de padrões alimentares durante a adolescência e massa mineral óssea aos 18 anos de idade: uma análise da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 1993”, ainda não foi elaborado, tendo em vista que até pouco tempo os dados do Questionário de Frequência Alimentar (QFA), do acompanhamento dos 18 anos, não haviam sido disponibilizados.

Desta forma, solicito a substituição deste último pelo artigo intitulado “Body mass index during adolescence and bone mass at 18 years old: a path analyzes in the 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil”, o qual desenvolvi durante o período de doutorado sob orientação da minha orientadora e com a colaboração de outros docentes do programa. O mesmo já se encontra em inglês e será submetido à revista *Osteoporosis International*.

Gostaria de manifestar ainda meu desejo de poder, tão logo seja possível, desenvolver o artigo que havia sido proposto.

Atenciosamente,

Ludmila Correa Muniz

## **II. Relatório do trabalho de campo**

---

Relatório parcial do trabalho de campo. O relatório oficial final encontra-se disponível no endereço eletrônico [www.epidemiologia.ufpel.org.br](http://www.epidemiologia.ufpel.org.br)



**Universidade Federal de Pelotas**  
**Faculdade de Medicina**  
**Departamento de Medicina-Social**  
**Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia**



**COORTE DE NASCIMENTOS DE 1993 DE PELOTAS-RS:  
ACOMPANHAMENTO DOS 18 ANOS.**

**Relatório do Trabalho de Campo**

**Pelotas - RS - Brasil**

**2011-2012**

## **1. HISTÓRIA BREVE DA COORTE DE NASCIMENTOS DE 1993: ACOMPANHAMENTOS DE 1993 A 2008**

No ano de 1993 todos os nascidos vivos na zona urbana do município de Pelotas e cujas famílias residiam no local foram elegíveis para participarem de um estudo longitudinal, que objetivou avaliar alguns aspectos da saúde dos participantes. Foram realizadas visitas diárias às cinco maternidades da cidade de primeiro de janeiro a 31 de dezembro daquele ano. As mães responderam a um questionário contendo informações demográficas, socioeconômicas, reprodutivas, comportamentais, assistência médica e morbidade da família. Foram coletados dados maternos e do recém-nascido. Ocorreram 5.304 nascimentos, 55 óbitos fetais e houve 16 recusas em participar do estudo, sendo obtidas informações em 1993 para 5.249 nascidos vivos, caracterizando o estudo perinatal e o tamanho de amostra dessa coorte. Subamostras de crianças desta coorte foram visitadas com um mês, três e seis meses e com um, quatro, seis e nove anos de idade. Nos anos de 2004 (11 anos), 2008 (15 anos) e 2011 (18 anos) todos os membros da coorte foram procurados para um novo acompanhamento.

### **1.1 Amostragem dos acompanhamentos de um e três meses**

Através da amostragem sistemática de 13% da coorte inicial, foram selecionados 655 membros para os acompanhamentos de um e três meses. Nesses acompanhamentos, questionários padronizados foram preenchidos pelas mães, buscando-se obter informações sobre morbidades, padrões de aleitamento materno, serviços de saúde e utilização de medicamentos. Medidas antropométricas das crianças foram novamente aferidas.

### **1.2 Amostragem dos acompanhamentos dos seis meses, um ano (1994) e quatro anos (1997)**

Nestes três períodos, uma nova estratégia amostral foi realizada. Todos os 510 recém-nascidos com baixo peso (< 2.500 g) foram acrescentados a uma amostra composta por 20% das crianças da coorte inicial, totalizando 1.460 indivíduos. Os 13%

selecionados aos um e três meses faziam parte da amostra desse acompanhamento. Essa estratégia, que sobrerrepresentou os participantes com baixo peso, exige que análises ponderadas sejam realizadas quando se utilizam os dados desses acompanhamentos. Os fatores de ponderação a serem empregados são 0,33 e 1,28.

### **1.3 Amostragem dos acompanhamentos dos 6 (1999) e 9 anos (2002)**

Em 1999, quando os pertencentes da coorte de 1993 estavam com seis anos de idade uma amostra aleatória para avaliação da saúde pulmonar e saúde bucal foi selecionada. Um total de 532 crianças foram submetidas a espirometria e testes cutâneos de puntura e 359 realizaram exame de saúde bucal. Na ocasião também se aplicou um questionário aos pais das crianças ou seus responsáveis. Em 2002, aos nove anos de idade 172 crianças da coorte original foram visitadas para a realização de exames de composição corporal.

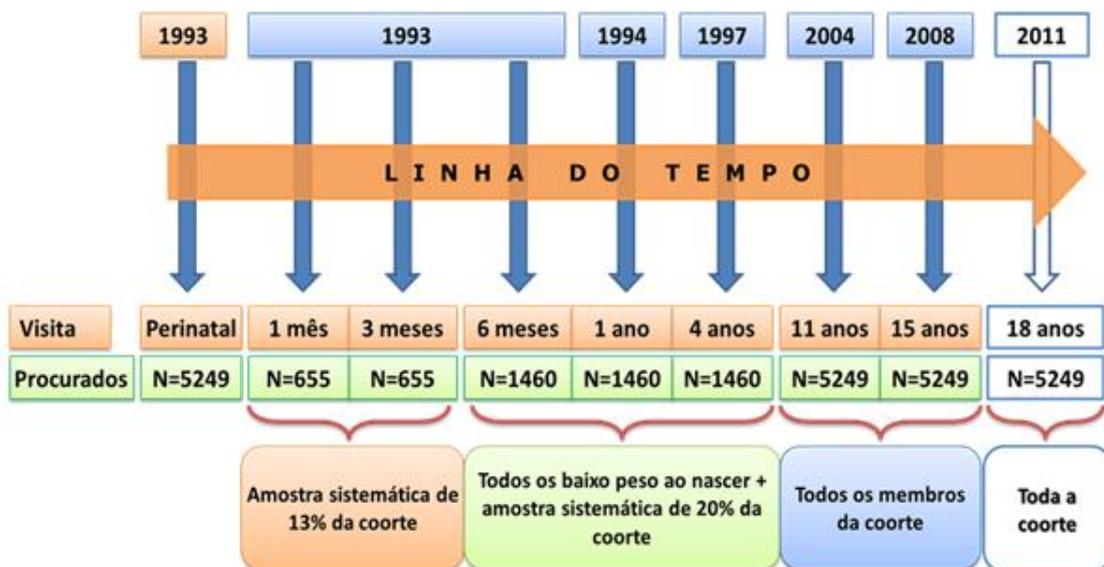
### **1.4 Acompanhamento dos 11 anos (2004)**

Em 2004 quando os adolescentes da coorte tinham 11 anos, realizou-se uma nova visita com objetivo de encontrar os 5.249 nascidos vivos participantes da coorte inicial, tendo sido encontrados e entrevistados 87,5% da amostra inicial.

### **1.5 Acompanhamento dos 15 anos (2008)**

No ano de 2008 foi realizado o oitavo acompanhamento da coorte de 1993. Todos os indivíduos pertencentes a esta coorte – com 15 anos – foram contatados para nova etapa. Ampliando os objetivos e qualificando os métodos de pesquisa, esse acompanhamento acrescentou aos acompanhamentos anteriores informações sobre comportamento sexual e reprodutivo, coleta de material biológico para análises genéticas (sangue e saliva) e função pulmonar. Com o intuito de facilitar a logística e melhorar a qualidade das medidas foi instituída uma “Central de Medidas” situada no Centro de Pesquisas Epidemiológicas Dr. Amílcar Gigante (CPE).

As Figuras 1 e 2 apresentam um breve resumo dos acompanhamentos e amostragens realizadas nessa coorte de nascimentos até o ano de 2011.



**Figura 1.** Principais acompanhamentos da coorte de nascimentos de 1993.



**Figura 2.** Subestudos da coorte de nascimentos de 1993.

## **2. ACOMPANHAMENTO DOS 18 ANOS (2011-12)**

Em 2011, quando os indivíduos da coorte original completavam 18 anos, iniciou-se um novo acompanhamento, cujo projeto intitulou-se “Influências precoces e contemporâneas sobre a composição corporal, capital humano, saúde mental e precursores de doenças crônicas complexas na Coorte de Nascimentos de 1993, em Pelotas, RS”.

Na preparação deste acompanhamento algumas estratégias foram utilizadas com objetivo de localizar os membros da coorte. Estas estratégias serão descritas no item 3.

## **3. ATIVIDADES ANTERIORES AO INÍCIO DO TRABALHO DE CAMPO**

### **3.1 Localização dos participantes da coorte**

Diversas estratégias de busca foram adotadas para localizar os participantes do estudo, na maioria das vezes simultaneamente, visando reduzir as perdas de acompanhamento. Quando localizados, tanto adolescentes e/ou pais ou responsáveis eram informados verbalmente sobre a realização de uma futura visita. Cada um dos métodos utilizados encontra-se descrito na sequência.

#### **3.1.1 Atualização do banco de endereços dos 15 anos (2008)**

No mês de agosto de 2009, ou seja, um ano após o término do acompanhamento dos 15 anos, reiniciou-se o contato com os membros da coorte de nascimentos de 1993. A partir dos dados coletados anteriormente, foram geradas e impressas listas contendo dados de identificação, como: número e nome do adolescente, nome da mãe e do pai, endereço e telefone (quando disponíveis). Foram realizadas ligações telefônicas para atualização dos endereços e telefones obtidos no passado. Quatro bolsistas foram disponibilizados e treinados para realizar as atualizações de endereços, contatos telefônicos e de outras informações (ponto de referência da residência, nome e/ou endereço da escola e/ou trabalho e contato de algum parente ou conhecido próximo). Foram realizadas ligações do Centro de Pesquisas Epidemiológicas (CPE) para todos os contatos existentes no banco de dados do último acompanhamento.

### **3.1.2 Alistamento Militar**

Em dezembro de 2010 foram realizadas reuniões com o chefe do Alistamento Militar e responsáveis pela Junta do Serviço Militar de Pelotas com o objetivo de solicitar a permanência de uma pessoa treinada para identificar os membros da coorte de 1993 que fossem efetuar o alistamento. Entre os meses de janeiro e abril de 2011, os jovens nascidos em 1993 compareceram à Junta, para a obtenção do Certificado de Alistamento Militar (CAM). Nesta ocasião todos os dados que facilitassem contatos posteriores foram anotados e atualizados no banco de dados da coorte.

### **3.1.3 Quartel**

A terceira estratégia de busca, em 2010, foi realizada por ocasião do exame médico obrigatório no quartel, durante o período de 11 de julho a 19 de agosto de 2010. Foram designados doutorandos que se revezavam para acompanhar uma assistente de pesquisa na entrega de folders informativos sobre o estudo e importância da participação de todos, confeccionados especialmente para fazer o chamamento dos adolescentes homens, para o acompanhamento que teria início logo. No quartel, os jovens eram reunidos em um só local e convidados a sentarem e ouvirem a assistente discorrer sobre o estudo e realizar a leitura do folder. Nesta ocasião, os jovens eram avisados que seriam chamados para um novo acompanhamento (setembro de 2011) através de um telefonema agendando o dia de seu comparecimento à clínica localizada junto ao CPE.

### **3.1.4 Entrega de folders para as meninas**

Quatro rastreadores foram contratados para se deslocarem até os endereços das meninas que constavam do banco de dados e entregarem o folder com a divulgação do acompanhamento de 2011-12. Esse mesmo processo também foi realizado para os meninos não encontrados no alistamento militar ou no quartel.

### **3.2 Reuniões e organização do acompanhamento dos 18 anos da coorte de 1993**

A equipe da coorte iniciou o trabalho de organização e preparação do trabalho de campo, elaboração e testagem dos questionários em outubro de 2009. Semanalmente ou quinzenalmente, a equipe de pesquisadores e doutorandos envolvidos com a coorte de 1993 se reunia para a discussão dos temas a serem estudados no acompanhamento, variáveis a serem investigadas e discussão sobre a logística da coleta dos dados.

### **3.3 Testagem (estudo pré-piloto) dos instrumentos**

Os questionários tiveram sua primeira versão impressa e foram testados pelos doutorandos e membros colaboradores da coorte em vários jovens com idade semelhante aos adolescentes nascidos em 1993. O teste serviu para avaliar o tempo gasto na aplicação e a compreensão por parte dos entrevistados.

O questionário geral foi elaborado na versão papel e, posteriormente, inserido no formato digital para ser aplicado através do uso de *Personal Digital Assistant* (PDAs), utilizando o software *Pendragon*.

### **3.4 Confecção das roupas para os exames de composição corporal**

Foi necessária a confecção de roupas justas especiais para a realização dos exames de composição corporal. O equipamento Bod Pod exigia o uso de roupas e toucas justas e o Photonic (scanner corporal) não permitia o uso de roupas de cor preta. Por isso, foram adquiridos conjuntos que consistiam em uma touca de borracha (de natação), um par de protetores de pés (propé em TNT) e um roupão descartável (roupão em TNT). As roupas confeccionadas especialmente para uso nos equipamentos foram: bermuda e blusa regata de elastano, em cor verde clara, com tamanhos P, M, G e XG.

### **3.5 Recrutamento e seleção de pessoal**

Nos meses de julho e agosto de 2012 (15 a 30/07 – inscrições; 01 a 05/08 – entrevistas) ocorreu a seleção e recrutamento de pessoal para trabalhar no acompanhamento. A supervisora de campo da coorte juntamente com uma das pesquisadoras analisaram 87 currículos de candidatos de ambos os sexos, maiores de 18 anos de idade, com ensino médio completo e disponibilidade. Após análise dos currículos, entrevista, disponibilidade de tempo e experiência com pesquisa foram selecionadas 52 pessoas. Destas, foram selecionados 35 candidatos para participarem do treinamento do questionário geral, incluindo 12 que também fizeram parte do treinamento da antropometria. As outras 17 pessoas pré-selecionadas foram chamadas apenas para o treinamento dos equipamentos de composição corporal. Para a antropometria e o questionário geral foram treinadas apenas mulheres, enquanto que para o treinamento dos equipamentos, alguns homens também foram incluídos.

#### **3.5.1 Avaliação e Seleção da Equipe**

As candidatas treinadas para o questionário geral foram avaliadas através de uma prova teórico-prática. A seleção levou em consideração o desempenho objetivo em cada questão do teste e a subjetividade dos observadores (supervisora, coordenadores e doutorandos) sobre atitude, postura, comportamento e desempenho durante o treinamento.

A média foi calculada com base na nota da avaliação subjetiva e da prova. Foram consideradas aprovadas aquelas candidatas que obtiveram média igual ou superior a 6,0 e foram selecionadas para o trabalho seguindo a ordem de classificação até serem completas as vagas.

Um total de 27 candidatas foram aprovadas e selecionadas como entrevistadoras titulares. As demais candidatas aprovadas ficaram como suplentes.

Para os equipamentos, o critério de seleção foi baseado na compreensão e habilidade em manusear o aparelho. Foram selecionadas dez pessoas que atingiram os critérios.

Cabe ressaltar que ao final da etapa de treinamento, com um intervalo de uma semana, foram chamados os candidatos selecionados para nos dias um e dois de setembro de 2011 serem retreinados na sua respectiva função/aparelho.

### **3.6 Estudo Piloto**

No dia 3 de setembro de 2011 foi realizado o estudo piloto do acompanhamento 2011-12. Coordenadores, pesquisadores, supervisora de campo e doutorandos observaram toda a logística para o funcionamento da clínica da coorte de 93.

Os candidatos aprovados e selecionados para trabalharem no acompanhamento foram divididos em dois grupos para que em um momento servissem de “jovens” para as entrevistas e exames corporais e, posteriormente, fossem os responsáveis pela coleta de dados. Essa estratégia permitiu estabelecer o fluxo a ser adotado (desde a chegada do jovem à clínica), leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), realização dos exames nos equipamentos e dos questionários e, principalmente, ajudou a estimar o tempo gasto para realização de todas as medidas.

## **4. INÍCIO DO TRABALHO DE CAMPO DA COORTE DE 93 (C93) EM 2011-12**

O trabalho de campo teve início no dia cinco de setembro de 2011, no turno da manhã (8:00 horas) nas dependências do prédio B do CPE, na clínica do CPE.

O atendimento aos adolescentes foi realizado de segunda a sexta, em dois turnos de trabalho de seis horas corridas, os quais aconteciam das 8:00 às 14:00 (turno da manhã) e das 14:00 às 20:00 (turno da tarde). Nos sábados o período de atendimento era das 9.00 às 17.00 h.

#### 4.1 Logística da C93 na Clínica do CPE

Os adolescentes tinham sua visita agendada pelo telefone. A coorte contava com uma assistente de pesquisa responsável apenas pelos agendamentos. A ordem das ligações obedecia a data de nascimento dos jovens, na intenção de não contatar inicialmente aqueles adolescentes que ainda não haviam completado 18 anos, para que os mesmos pudessem assinar os TCLEs.

O jovem agendado, ao chegar à clínica, era atendido na recepção, local destinado a receber o adolescente. Neste momento, era solicitado um documento para certificação de que se tratava de um adolescente da coorte de 93. O nome do adolescente era conferido com o que constava na planilha de agendamentos. Caso não estivesse com um documento, perguntava-se o nome completo da mãe e esse era conferido em um banco de dados disponível num dos computadores da recepção. Ainda na recepção, o adolescente recebia um crachá (previamente elaborado) para usar durante todo o tempo que estivesse naquele local. Este crachá além de identificar o jovem, mostrava todos os locais pelos quais o adolescente deveria passar, garantindo desta forma que o acompanhado respondesse a todos os questionários e realizasse todos os exames previstos. Os crachás eram diferentes. Havia quatro cores de crachá. O crachá branco era o único que apontava que o jovem não fazia parte de nenhum subestudo. Após a entrega do crachá, a recepcionista entrava em contato com a responsável pelo fluxo dos questionários, para a mesma disponibilizar uma entrevistadora. A recepcionista encaminhava o adolescente a essa entrevistadora juntamente com o TCLE.

Com o jovem, a entrevistadora fazia a leitura do TCLE. Ao final da leitura, no caso de ser menina, se ela mencionasse que estava grávida ou poderia estar não eram realizados os exames de composição corporal. Ao final do TCLE constava uma lista com os procedimentos (questionários e exames) que seriam realizados na C93 e o jovem deveria marcar um “X” em todos aqueles itens que estivesse de acordo em fazer. Nos casos em que o adolescente tivesse dúvida sobre algum exame, a entrevistadora lia uma descrição padronizada sobre o que era realizado, que também estava afixada nas salas de exames. Se persistisse a dúvida ou o adolescente se recusasse ou relatasse possuir algum impedimento para a realização (critério de exclusão para determinado exame), o doutorando de plantão era chamado para assinalar tal ocorrido no crachá ou reverter a recusa. Os seguintes códigos eram utilizados pelos doutorandos:

R = recusa

G = grávida

PG = possível gravidez

CE = critério de exclusão

Após assinatura do TCLE, o adolescente era conduzido para as responsáveis pelo fluxo da clínica as quais o encaminhava para as entrevistas ou para os equipamentos.

A clínica ficou dividida em dois espaços, um para a aplicação dos questionários e outro para a realização de exames. Cada espaço era controlado por uma pessoa que portava uma planilha para controle do fluxo dos questionários e por outra que controlava a dos equipamentos.

Na parte das entrevistas eram aplicados todos os instrumentos: questionário geral, questionário confidencial, QFA, M.I.N.I. e QI - WAIS. Na parte dos equipamentos eram realizados os seguintes exames: plestimografia (Bod Pod), densitometria (DXA), avaliação das dimensões corporais (Photonic Scanner), espirometria, ultrassom de carótidas, coleta de sangue, antropometria (pregas cutâneas subescapular e tricipital; circunferência da cintura; perímetro braquial; altura e altura sentado) e pressão arterial.

#### **4.1.1 “Fluxo” dos exames**

O membro da coorte era conduzido pela responsável pelo entretenimento até um vestiário para trocar sua roupa por aquela apropriada para os exames. Era necessária a retirada de qualquer objeto de metal para a realização dos exames de composição corporal. Durante o fluxo na parte dos equipamentos alguns pré-requisitos foram seguidos.

- *Bod Pod*: era o aparelho com maior prioridade, ou seja, sempre que possível era a primeira medida a ser realizada. Nessa estação era medida a altura e o peso do/a jovem e, ambos, anotados no crachá para que esses dados fossem utilizados em outros equipamentos, como o DXA e a espirometria. O/A participante permanecia dentro do aparelho, uma câmara fechada por alguns segundos e era orientado a não se mexer. Era obrigatório o uso de uma touca de natação.

- *DXA*: na sala do DXA o/a adolescente deitava na cama anexa ao aparelho e era realizado um scanner do seu fêmur, coluna e corpo inteiro. O/A adolescente não poderia ter pinos/placas nos ossos ou estar usando qualquer objeto de metal.

- *Photonic Scanner*: na sala do Photonic o/a jovem entrava na câmara escura, era posicionado e permanecia por alguns instantes sem se mexer. Neste aparelho o uso de qualquer tecido no corpo que não fosse a roupa fornecida pela pesquisa, gesso ou tatuagens grandes e escuras, atrapalhava a formação da imagem 3D e das medidas de circunferência.

- *Ultrassom de carótida*: a varredura das carótidas era realizada com o/a participante deitado em uma maca com a cabeça posicionada para o lado, para ser possível o acesso às artérias. A medida era realizada do lado esquerdo e direito.

- *Antropometria*: nesta sala, era verificada a pressão arterial e a circunferência braquial e a altura com o/a jovem sentado/a, além da circunferência da cintura e pregas cutâneas tricúspita e subescapular. Todas as medidas eram coletadas duas vezes e quando apresentava diferença entre a medida um e dois acima do erro aceitável, a terceira medida deveria ser realizada. O erro aceitável para cada medida era: 0,7 cm para altura sentada; 2 mm para a prega cutânea tricúspita e subescapular e 1 cm para a circunferência da cintura.

- *Espirometria*: a espirometria era realizada em duas etapas, antes e após o uso do broncodilatador (salbutamol 400 mcg). Era necessário um intervalo de 15 minutos entre a primeira e a segunda sequência de sopros. O/A jovem fazia o exame sentado/a.

- *Coleta de sangue*: a coleta era feita através de sistema fechado (a vácuo) e com o adolescente deitado em uma maca. Eram coletados cinco tubos totalizando 20 mL de sangue. A ordem de coleta era: 1 – Tubo com gel e ativador de coágulo: 5 mL; 2 – Tubo com citrato de sódio: 2 mL; 3 – Tubo com EDTA: 4 mL; 4 – Tubo com gel e ativador de coágulo: 5 mL; e – Tubo com EDTA: 4 mL. Posteriormente, o sangue coletado era levado para o laboratório de processamento situado no segundo andar da clínica do CPE.

Dentro de cada sala dos equipamentos havia uma ficha para anotações, denominada “Diário de campo”. Nesta ficha eram anotadas as intercorrências que

seriam posteriormente de interesse dos responsáveis e do estudo. Exemplos: na sala do DXA a ocorrência mais comum era em relação a existência de piercing em alguma parte do corpo e não poder realizar a medida no corpo inteiro, ou então o/a adolescente ser obeso/a ou muito alto/a de forma que seu corpo ultrapassava os limites da cama do aparelho.

#### **4.1.2 “Fluxo” nas entrevistas**

Na estação da clínica destinada aos questionários (geral, confidencial, saúde mental e QFA) não havia uma ordem preferencial para realização dos mesmos. Em cada uma das seis salas de entrevista do questionário geral e confidencial as questões eram registradas em PDAs. O QFA era aplicado em uma sala contendo quatro computadores e o seu preenchimento era supervisionado por uma monitora.

Todas as dúvidas que as entrevistadoras tinham sobre a resposta do/a jovem ou qualquer situação eram anotadas no diário de campo, a exemplo do que era feito nos exames. Em alguns casos elas consultavam o/a doutorando plantonista. Caso este não soubesse, consultava a pesquisadora responsável pelos questionários geral e confidencial.

Entre a realização dos exames e dos questionários era oferecido aos jovens um lanche (sanduíche + suco) e acesso a vídeo game, computadores com internet e televisão, na sala de recreação, a qual era supervisionada por uma monitora.

Antes de deixar a clínica o jovem recebia uma ajuda de custo pela sua participação (R\$50,00). O tempo médio que os jovens permaneciam na clínica variou do início até a metade-final do trabalho de campo. Inicialmente os jovens ficavam cerca de quatro horas na clínica. Com o passar do tempo isso foi reduzido em uma hora.

## **5. MANUAL DE INSTRUÇÕES PARA OS INSTRUMENTOS DE PESQUISA**

Os manuais de instruções do estudo serviam como guia e apoio para os entrevistadores e responsáveis dos equipamentos. Eles eram sempre utilizados nos casos de dúvidas, tanto no registro de informações no PDA, quanto para esclarecer sobre os

critérios de exclusão de exames, erros dos equipamentos, etc. Exemplares dos mesmos ficavam em cada sala de entrevista.

## **6. ESTRATÉGIAS DE BUSCA DE ADOLESCENTES DURANTE O TRABALHO DE CAMPO**

Algumas estratégias de busca dos adolescentes foram utilizadas no decorrer do trabalho para àqueles que não haviam sido encontrados/contatados ou que não compareceram na clínica do CPE após contato telefônico (agendamento).

### **6.1 Rastreamento de endereços não encontrados**

Duas rastreadoras foram contratadas com objetivo de localizar o domicílio daqueles adolescentes que não tinham telefone/contato. Com base em um levantamento dos endereços dos acompanhamentos anteriores (2004 e 2008) e de uma atualização realizada em 2010, as rastreadoras iam até esses endereços, do mais antigo até o mais recente e preenchiam um formulário. Num segundo momento, nos casos de não encontrarem o/a adolescente, era fornecido o endereço de parentes que tinham nos questionários antigos na parte de “referências”, para conseguir contato. Neste momento as rastreadoras deixavam o folder para o/a jovem e em alguns casos agendavam a visita do mesmo na clínica do CPE.

### **6.2 Divulgação na imprensa local e em redes sociais**

Com o objetivo de divulgar o acompanhamento da coorte de 1993 e trazer mais participantes do estudo para a clínica foram publicadas e divulgadas matérias na TV e rádios locais. Foram gravadas participações na Rede Nativa, RBS, TV Cidade – Canal 20 da TV fechada no Programa Vida Saudável, Rádio Universidade Católica, jornal Diário Popular, jornal Zero Hora, Rádio Atlântida e Rádio Federal FM.

Com o mesmo objetivo foram disponibilizados perfis da Coorte de 1993 em redes sociais.

### **6.3 Visitas domiciliares/Unidade Móvel (Van)**

Com o objetivo de encontrar jovens cujo contato era difícil, inexistente ou sem sucesso (vinda à clínica), visitas domiciliares começaram a ser realizadas em 14 de fevereiro de 2012. Foi alugado um carro (van) para deslocar parte da equipe até a residência dos adolescentes. A van percorria os vários bairros da cidade em busca de jovens que não compareceram na clínica após vários agendamentos telefônicos ou que o contato telefônico não tinha sido possível. Essa estratégia funcionava todas as tardes, de segunda a sábado. No mês de março a van também funcionou em um único domingo, sem sucesso (jovens não se encontravam na residência). Os participantes eram inicialmente convidados a vir à clínica. Se aceitassem, a van os trazia. Caso contrário eram entrevistados em domicílio.

## **7. CONTROLE DAS ENTREVISTAS/EXAMES**

Um controle semanal para informar a evolução do trabalho de campo era realizado através de um relatório elaborado pela equipe de banco de dados. Esse relatório apresentava um resumo da produção em um período de seis dias de trabalho de campo. Neste arquivo era apresentado o N geral do acompanhamento e por atividade/exame/procedimento realizado e as frequências (%) de resposta de algumas variáveis do questionário geral, como: uso de álcool, trabalho, osso quebrado, cigarro e uso de remédio nos últimos quinze dias. Esse conteúdo era enviado semanalmente pela equipe de dados para informar os pesquisadores, doutorandos e supervisora de campo sobre o andamento do trabalho de campo.

## **8. CONTROLE DE QUALIDADE DO TRABALHO**

### **8.1 Entrevistas**

No mês de janeiro iniciaram-se as ligações para o controle de qualidade da visita dos 18 anos. Foram sorteados 10% da amostra estudada, totalizando 413 adolescentes. O adolescente sorteado era contatado por telefone e eram feitas seis perguntas, quatro em relação ao questionário geral, uma sobre o questionário confidencial e uma sobre a medida da circunferência da cintura, presentes em um questionário simplificado padronizado. O controle de qualidade foi realizado por uma doutoranda. O banco foi digitado no programa estatístico EpiData versão 3.1 e transferido para o Stata 11.1 onde foram realizadas as concordâncias.

### **8.2 Equipamentos de composição corporal**

Os dados gerados pelos equipamentos eram conferidos semanalmente a fim de detectar possíveis erros e ficavam a cargo de um integrante da informática e dos doutorandos responsáveis por cada aparelho.

## **9. BANCO DE DADOS**

Dois doutorandos em conjunto com um pesquisador ficaram responsáveis pelo manejo dos dados durante todo o acompanhamento.

### **9.1 Questionários**

Os PDAs com as informações coletadas pelos questionários eram descarregados diariamente por uma pessoa responsável exclusivamente para essa tarefa. O questionário geral possuía onze blocos e para cada um deles era gerado um banco separadamente. Semanalmente (todas as quintas-feiras) essas informações eram

reunidas em um único arquivo para a construção do banco de dados. Além disso, semanalmente era gerado um banco com os dados da antropometria.

Os dados, quando extraídos do PDA, geravam um arquivo em Excel. Toda semana, para construir o banco de dados em Stata, legível e consistente, a equipe de dados seguia uma rotina, a qual está descrita abaixo:

Às quintas-feiras, o arquivo em Excel (que continha as informações referentes a uma semana de trabalho) era transformado em Stata pela pessoa responsável. Essa mesma pessoa rodava os scripts em cada um dos bancos (blocos do questionário e antropometria), a fim de nomear as variáveis e identificar números de identificação (ID) duplicados; posteriormente, esses bancos eram gravados em uma pasta no dropbox (“pré-processados”), em uma versão “c” (exemplo: bloco da antropometria da semana 01 → era salvo como *antro01c*).

Depois que os bancos, referentes a todos os blocos, já estavam no dropbox, um dos doutorandos (Ludmila Muniz) pegava as versões “c” e rodava novos scripts a fim de identificar possíveis inconsistências no preenchimento do questionário. Depois de corrigidas as inconsistências, os bancos eram salvos em outra pasta no dropbox (“processados”), na versão “d” (exemplo: bloco da antropometria da semana 01 → era salvo como *antro01d*). Semanalmente, os bancos referentes a cada bloco eram anexados ao banco da semana anterior e salvos no dropbox (em uma pasta chamada “append”); (exemplo: blocos da antropometria das semanas 01 e 02 → eram salvos como *antro01-02d*).

Finalmente, todos os bancos foram unidos em único arquivo, configurando o banco final deste acompanhamento. Os valores *missing* presentes no banco foram denominados como **.a** quando o registro correspondia a 8, 88 ou 888 (Não se aplica - NSA) e como **.b** quando o registro era referente a 9, 99 ou 999 (Ignora - IGN).

## 9.2 Equipamentos

Semanalmente as informações dos equipamentos eram descarregadas e, então, realizada a construção do banco de dados de cada aparelho. Cabe ressaltar que cada aparelho tem sua particularidade em relação à construção de banco de dados. Por

exemplo, os bancos da espirometria e do DXA são originalmente em formato Access (\*.mdb) enquanto o Bod Pod e o Photonic scanner tinham seus dados originalmente armazenados como formato texto (\*.txt). Portanto, scripts diferentes (em formato .do do Stata) eram necessários para cada aparelho.

Em suma, o arquivo .do organizava os bancos de dados de forma a cada linha representar a informação de um indivíduo e cada coluna as variáveis obtidas. Após isso, era rodado um script para verificar alguma inconsistência nos número de identificação (nquest) e no dígito verificador (dv). Cada doutorando responsável pelo seu aparelho verificava as inconsistências ou possíveis erros nas informações obtidas. Por fim, os bancos semanais eram inseridos conjuntamente através do comando “append” do Stata 12.0

## **10. REVERSÃO DE RECUSAS**

Alguns jovens recusaram participar do acompanhamento no primeiro contato com a responsável pelos agendamentos na clínica. Portanto medidas tiveram de ser tomadas para reverter tal situação.

### **10.1 Telefonemas**

No mês de janeiro de 2012 iniciou-se o processo de tentativas de reversão de recusas. Um doutorando era responsável pelo novo contato, com o auxílio de outros doutorandos, através de uma lista de nomes que haviam agendado visita na clínica, mas não haviam comparecido, ou aqueles que se recusavam participar da pesquisa. Os doutorandos ligavam para os jovens e tentavam reverter a situação por meio de propostas como: trocar horários, agendar visita com a van da C93 ou então negociar sobre os procedimentos que despertavam medo ou desconfiança por parte dos adolescentes. Cerca de 100 recusas foram detectadas, sendo que para 80 dessas foi possível o contato e cerca de 10% dessas foram revertidas.

## **11. OUTRAS CIDADES**

Alguns jovens aos 18 anos estavam residindo fora da cidade de Pelotas (N=334). Para esses adolescentes era feita a proposta de agendarem a visita e eram ressarcidos com o valor gasto com passagens até Pelotas no ato da apresentação das notas fiscais. Ao todo, compareceram 132 jovens de outras cidades na C93, sendo que 40 deles realizaram apenas os questionários.

## **12. ASPECTOS FINANCEIROS**

O controle financeiro da pesquisa ficou a cargo da coordenadora Ana Maria Baptista Menezes e do administrador do Centro de Pesquisas Epidemiológicas da Universidade Federal de Pelotas, Luis Fernando Barros. A supervisora de campo informava mensalmente ao administrador o total a ser pago para cada membro da equipe. A equipe de entrevistadoras recebia salários mensais fixos, enquanto que motoboys entre outros recebiam salários de acordo com a produção.

## **13. QUESTÕES ÉTICAS**

Alguns participantes da coorte, durante a realização da entrevista/exames ou posteriormente ao seu comparecimento na clínica do CPE, solicitavam atendimento médico com especialista por algum problema de saúde. A demanda era repassada para a supervisora do trabalho de campo a qual entrava em contato com profissionais capazes de indicar local ou profissional ou solucionar o problema. Em alguns casos, os pesquisadores também eram comunicados sobre as demandas e, sempre que possível, aceleravam o processo de consulta ou resolução do problema. Sempre que possível, os casos eram encaminhados para um atendimento gratuito e de qualidade. Foi indispensável à colaboração dos profissionais: Victor Castagno (oftalmologista), Flávio Demarco (odontólogo), Rogério Linhares (clínica médica), Eduardo Machado (clínica médica e endocrinologia), Silvana Orlandi (avaliação nutricional e dietoterapia) e Isabel Oliveira (tipagem sanguínea).

## 14. ALGUNS RESULTADOS DO TRABALHO DE CAMPO

O número de avaliados em relação aos questionários e equipamentos de composição corporal encontram-se apresentados nos quadros abaixo.

**Quadro 1.** Número de adolescentes de acordo com a situação nos questionários.

Questionários	AVALIADOS	CE	R	G	PG	TEL.	NR	CASE	DR	DNR	TOTAL
Geral	4130	4	0	54	8	55	20	1	13	0	4106
Confidencial	4048	27	0	0	0	29	2	0	0	2	4106
M.I.N.I	4054	3	0	54	8	0	49	1	13	0	4106
Q.I.	4051	6	0	54	8	0	49	1	13	0	4106
QFA	4072	0	0	0	0	30	2	1	1	0	4106

**Quadro 2.** Número de adolescentes de acordo com a situação nos equipamentos de composição corporal.

APARELHO	AVALIADOS	CE	R	G	PG	TEL.	NR	CASE	DR	DNR	TOTAL
Acelerometria	3788	125	9	51	8	48	33	0	44	0	4106
Antropometria e Pressão arterial	3987	4	1	53	6	48	6	0	1	0	4106
Bod Pod	3973	9	4	53	6	48	6	1	2	4	4106
DXA	3973	8	4	53	7	48	6	1	2	4	4106
Espirometria 1	3899	84	8	53	7	48	6	0	1	0	4106
Espirometria 2	3866	103	19	53	7	48	6	0	4	0	4106
Photonic	3975	7	5	54	6	48	10	0	1	0	4106
Ultrassom	3964	5	1	53	6	48	5	1	19	4	4106

CE: critério de exclusão

R: recusou

G: gestante

PG: possivelmente grávida

TEL.: entrevista feita por telefone

NA: não avaliados

CASE: internados no Centro Sócio Educativo (CASE)

DR: entrevista feita no domicílio e realizou exames na clínica

DNR: entrevista feita no domicílio e não realizou exames na clínica

### 14.1 DXA

No caso particular da densitometria todos os exames realizados pelos técnicos foram avaliados pelo doutorando responsável, o qual decidiu excluir 25 exames devido a diferentes tipos de erros, dentre estes, três adolescentes tiveram suas imagens

deletadas do banco de dados por apresentarem alguma má-formação física. No quadro abaixo são descritas as exclusões.

**Quadro 3.** Imagens eliminadas e motivo da exclusão.

<b>Número</b>	<b>Participante</b>	<b>Exame eliminado</b>	<b>Motivo</b>
1	934797-6	Corpo inteiro	Braço esquerdo lesionado
2	930689-7	<b>Todos</b>	Má-formação
3	936086-7	<b>Todos</b>	Má-formação
4	930653-6	Corpo inteiro	Imagem tremida
5	931888-7	Corpo inteiro	Má-formação no braço esquerdo
6	930832-6	Coluna	Não aparece L4
7	932380-5	Corpo inteiro	Imagem tremida
8	935090-9	Coluna	Não aparece L1
9	935624-5	Corpo inteiro	Escoliose deformante
10	935310-0	<b>Todos</b>	Hemicorpo esquerdo hipotrófico
11	931562-4	Corpo inteiro	Sem pés
12	932900-5	Coluna	Não aparece L4
13	931430-9	Corpo inteiro	Imagem tremida
14	930385-5	Coluna	Não aparece L1
15	933254-5	Corpo inteiro	Imagem tremida
16	930240-9	Corpo inteiro	Má-formação no braço direito
17	930285-9	Corpo inteiro	Má-formação no braço direito
18	930552-1	Corpo inteiro	Lesão antebraço esquerdo
19	930554-8	Corpo inteiro	Imagem tremida
20	933545-5	Coluna	Não aparece L4
21	930825-3	Corpo inteiro	Imagem tremida
22	930809-1	Corpo inteiro	Sem pés
23	931784-8	Coluna	Não aparece L4
24	935841-2	Corpo inteiro	Sai das linhas laterais
25	932426-7	Corpo inteiro	Sem pés

## **15. PERCENTUAIS DE LOCALIZAÇÃO, PERDAS E RECUSAS**

Das 5249 crianças nascidas vivas em 1993, 163 foram detectadas como óbitos (até abril de 2012). Dentre os 5086 restantes, 4526 foram localizados durante o acompanhamento, sendo que destes, 4106 foram entrevistados e 3991 realizaram no mínimo um exame corporal. Dessa maneira, optou-se por considerar no acompanhamento aqueles indivíduos que completaram as entrevistas, os quais, somados aos óbitos, representaram um percentual de 81,3% de acompanhados.

Foram identificados 333 jovens residindo fora de Pelotas. Dessa forma, foi realizado contato telefônico com a grande parcela destes jovens. Por motivo deste contato foi possível que 87 adolescentes fossem até a CC93 para responder aos questionários e realizar os exames corporais. Também foram feitas 50 entrevistas telefônicas e os jovens apesar de terem sido convidados a comparecerem na CC93 para realizarem os exames corporais, a maioria não compareceu.

Dos 4526 adolescentes localizados aos 18 anos de idade, 127 (2,3%) deles recusaram-se a participar do estudo e 110 (2,0%) foram considerados como perdas, e mesmo após várias tentativas para que participassem, eles não compareceram à CC93.

## **16. ATIVIDADES E FUNÇÕES DE RESPONSABILIDADE DA DOUTORANDA**

- \* Colaboração na construção do questionário de frequência alimentar;
- \* Participação na localização dos indivíduos homens da coorte, através de visitas ao quartel durante o exame obrigatório, acompanhando a assistente de pesquisa designada para a tarefa;
- \* Contribuição na seleção da equipe de trabalho;
- \* Responsável técnica pelas medidas antropométricas e pressão arterial, bem como pela elaboração dos manuais de instruções e treinamento das antropometristas;
- \* Participação no estudo piloto;
- \* Supervisora do trabalho de campo em turnos alternados com os demais doutorandos da C93;

\* Responsável pelo banco de dados juntamente com outro doutorando e pesquisador da C93.



## **1. Artigo de revisão**

---

Submetido à revista *International Breastfeeding Journal*.

**Effect of breastfeeding on bone mass from childhood to adulthood: a systematic  
review of the literature**

**Authors:**

Ludmila Correa Muniz<sup>1</sup> (LCM) [ludmuniz@yahoo.com.br](mailto:ludmuniz@yahoo.com.br)

Ana Maria Baptista Menezes<sup>1</sup> (AMBM) [anamene@terra.com.br](mailto:anamene@terra.com.br)

Romina Buffarini<sup>1</sup> (RB) [romibuffarini@gmail.com](mailto:romibuffarini@gmail.com)

Fernando Cesar Wehrmeister<sup>1</sup> (FCW) [fcwehrmeister@yahoo.com.br](mailto:fcwehrmeister@yahoo.com.br)

Maria Cecília Formoso Assunção<sup>1</sup> (MCFA) [cecilia.epi@gmail.com](mailto:cecilia.epi@gmail.com)

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Epidemiology. Federal University of Pelotas. Brazil.

**Corresponding author:**

Ludmila Correa Muniz

e-mail: [ludmuniz@yahoo.com.br](mailto:ludmuniz@yahoo.com.br)

Post-Graduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas.

Street: Marechal Deodoro 1160 (3º andar). CEP: 96020-220. Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. Phone: +55 (53) 3284-1302 Fax: +55 (53) 3284-1300

## **Abstract**

**Background:** Literature has presented conflicting results about the short- and long-term effects of breastfeeding on bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD). We conduct a systematic review to assess the relationship between breastfeeding and bone mass in children, adolescents and adults.

**Methods:** A literature review was concluded in September 2014 in MEDLINE, Web of Science and LILACS databases and articles published between 1998 and 2013 were included. Studies using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) instrument to assess the bone mineral content and/or bone mineral density (BMD) of total body, lumbar spine, femoral neck, or at least one of these sites were included in the review.

**Results:** From the 648 references identified, 11 were selected, ten of which had a longitudinal design. All studies were conducted in high-income countries, six evaluated the outcome in children, four in adolescents and one in young adults (<35 years). Of the studies that assessed the outcome in childhood, two found a positive association and the others showed a negative effect of breastfeeding on bone mass. In adolescence, three studies showed a positive association between breastfeeding and bone outcomes. Among adults, a negative effect of increased breastfeeding duration was observed only in men.

**Conclusions:** There is no consensus on the effects of breastfeeding on bone mass at different ages. The most consistent results about the positive effect of breastfeeding on bone health are observed in adolescents.

**Keywords:** Absorptiometry; Breast feeding; Bone density; Review.

## **Background**

Development of the skeleton and subsequent bone health is influenced by a complex interaction of genetic, demographic, socioeconomic, hormonal and environmental factors [1]. Based on evidence from life course studies, early factors inherent to the intrauterine period and early years of life can also influence bone outcomes, as suggested by Barker's hypothesis [2-4].

To the best of our knowledge, no evidence exists concerning the relationship between intrauterine nutrition and bone mass. However, the association between nutritional exposure during the first year of life and bone mass at different ages has been assessed in some studies. With regard to breastfeeding, results of investigations into its short and long-term effects on bone mineral content and/or density are conflicting. Some authors have shown a positive effect of breastfeeding on bone mass in childhood and adolescence [5-9]. However, other studies have found no association or a negative effect of breastfeeding on bone mass outcomes [10-15].

The practice of breastfeeding is widely recommended by health bodies, given the immediate health benefits for the infant, many of which persist into adult life [16]. In addition, knowledge on the early modifiable factors influencing bone mass acquisition could allow prevention of osteoporosis and osteoporotic fractures, problems that represent a major social and financial burden for society [17].

Therefore, the objective of the present review was to investigate the relationship between breastfeeding and bone mass during childhood, adolescence and/or adult life. In view of the heterogeneity in approaches for assessing the exposure of interest, it was decided to perform a systematic review of the literature as opposed to a meta-analysis.

## **Methods**

### *Search strategy*

The literature search, concluded in September 2014, was carried out on the MEDLINE/PubMed, Web of Science (WoS) and Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) data bases using free terms for the searching of references. Two groups of key words were created using the connectors “OR” and

“AND”, within each group and between the groups, respectively. The terms used for the definition of bone mineral content or density were: “bone mass”, “bone density”, “bone mineral density”, “bone mineral content”, “bone area”, “bone health” and “osteoporosis” (first group). For the exposure of interest, the second group included the terms “breast feeding”, “breast feeding, exclusive”, “breastfeeding”, “breastfeeding, exclusive” and “milk, human”. There were no constraints on publication date or language.

#### *Inclusion/exclusion criteria of articles*

The criteria for inclusion of articles were: being original; having evaluated the relationship between breastfeeding and bone mineral content (BMC) and/or bone mineral density (BMD) during childhood, adolescence or in adults; and having used the Dual-energy X-ray Absorptiometry method (DXA) for assessing BMC and/or BMD of the whole body, lumbar spine, neck of the femur or in at least one of these sites.

Studies involving animals or specific population groups such as volunteers, twins and individuals who were sick, premature, with low birth weight or small for gestational age were considered ineligible.

#### *Selection and quality assessment of articles*

After the search process, the references were imported into the software EndNote X3 (Thompson Reuters, USA) and duplicate references excluded. All the stages of article selection were performed independently by two authors (LCM and RB) and, in cases lacking consensus, a third author (MCA) was consulted. Initially, the authors performed a reading of the titles, excluding those which did not address the association of interest or fulfil the previously defined inclusion criteria. Subsequently, abstracts were read followed by full reading of those articles deemed relevant. After this stage, the lists of references of the selected articles were checked, yielding no further studies.

An adapted version of the scale proposed by Downs & Black [18] was used for the assessment of the methodological quality of the selected articles. Adaptation was required because some items in the original scale did not apply to the cross-sectional,

observational or cohort studies. Thus, out of the original 27 items, a total of 17 were assessed as shown in Table 1.

Each item was scored as 0 (no) or 1 (yes), with the exception of item four, which was assigned scores of 0 (no), 1 (partially) or 2 (yes). Final score ranged from zero to 18 points. Based on the score attained, the articles assessed were classified as: low internal validity (0-5 points), intermediate internal validity (6-11 points) and high internal validity (12-18 points). The articles were assessed for these criteria independently by two authors (LCM and RB) and, in cases without consensus, a third author (MCA) was consulted.

## **Results**

A total of 648 references were retrieved, comprising 380 on Pubmed, 251 on WoS and 17 on the LILACS databases. After exclusion of 100 duplicated references, 548 were selected for reading of the titles. Upon conclusion of the selection process, 11 articles were included in the review. All phases of the reference selection process, as well as the number of studies included and excluded at each stage, can be seen in the flow chart depicted in Figure 1.

The main characteristics of the 11 articles included in this review are given in Table 2. All of the studies were published in English between 1998 [13] and 2013 [5,8,11], comprising ten cohort studies [5-12,14,15] and one cross-sectional studies [13]. Sample sizes ranged from 35 [13] to 599 [12] subjects. Six of the studies assessed outcome in children (<10 years) [5,7,10,12,13,15], four tracked adolescents (10-19 years ) [6,8,9,1] and one involved young adults (<35 years) [14]. All the studies were carried out in high-income countries. Median score obtained on the Downs & Black assessment was 15 points (minimum 10 and maximum 16 points). Based on the results of this assessment, nine out of the eleven articles were classified as having high internal validity.

The breastfeeding variable was assessed differently by the studies. Three studies [11,13,15] assessed the effect of exclusive breastfeeding (EBF) compared to infant formula feeding. Of the breastfeeding studies, one assessed EBF up to the third month of life [11], one from birth to the fourth month [15] and the other up to the fifth

month of life [13]. Five studies assessed the effect of breastfeeding (yes/no) irrespective of mode or duration [5-8,10]. Five studies [7-9,12,14] assessed the effect of duration of exclusive breastfeeding (irrespective of type) on bone mass measurements. Only one study [9] assessed the effect of duration of EBF on BMC and BMD.

With regard to bone mass measurements, of the eleven studies, eight assessed BMC and BMD [6,7,9,11-15], two assessed BMC only [5,10] while one evaluated BMD only [8]. Regarding the anatomical sites studied, three studies assessed bone mass at three sites: whole body, lumbar spine and neck of the femur [5,7,14]; three studies assessed whole body only [10,12,15]; one investigated lumbar spine only [13] whereas four studies assessed both whole body and lumbar spine [6,8,9,11].

#### *Effect of breastfeeding on bone mineral mass*

Among the studies assessing the association of interest in children, two found a positive association between breastfeeding and bone mass measurements [5,7]; one showed a negative effect of exclusive breastfeeding [10] while three observed no association at all [12,13,15]. Among the outcome assessments during adolescence, three studies detected a positive association between breastfeeding [6,8] and longer duration of EBF [9] with bone outcomes while one study found no association [11]. For the study performed in adults [14], a negative effect of longer exclusive breastfeeding on BMC and BMD was found in male subjects only.

## **Discussion**

The number of relevant articles found in the present review was small, evidencing the reduced number of studies assessing early feeding determinants of bone mineral mass in later life. This low number might be because the present review only assessed the effect of breastfeeding on bone mineral mass in individuals born at term with normal weight for gestational age. Studies conducted in preterm newborns were excluded (<37 weeks' gestation), since this group potentially has suboptimal mineralization, given that bone mineral deposition is most intense and rapid during the third trimester of pregnancy [19]. Consequently, these neonates tend to exhibit mineral deficiency at birth, a situation often aggravated by practical difficulties in ensuring adequate intake of minerals during the neonatal period [19]. Thus, it is likely that effects

of breastfeeding on bone mineral mass, over the short and long-term, in preterm infants differs from those observed in term infants.

Although the literature has confirmed the influence of early feeding exposures on body composition in later life, the relationship between breastfeeding and bone mineral mass is complex. In the present literature review, the studies which found a positive effect of breastfeeding (irrespective of type or duration) on BMC and/or BMD showed that breast milk-fed infants had greater bone mass in the first year of life [5], at the age of 8 [7] and at 16 [6,8] years of age, compared to formula-fed infants. Human milk contains lower levels of the nutrients essential for bone mineralization, such as calcium, phosphorus and vitamin D [7], compared to infant formulas and other types of milk. Notwithstanding, there are several explanations for the beneficial effect of breast milk, namely: (1) despite the lower concentration of calcium and phosphorus in human milk, the bioavailability and absorption of these nutrients is greater than other types of milk [7]; (2) consumption of breast milk results in the intake of 200mg of calcium per day on average [20,21], a sufficient amount to promote good skeletal development during infancy, which can persist into later life; and also, (3) the potentiating effect of breast milk on bone development may stem from a non-nutritional factor [19]. Furthermore, early exposure to breast milk, albeit for a brief period, can lead to changes in the programming of bone cells, resulting in greater bone mass in later life [23].

With respect to breastfeeding duration, Jones et al. [7] showed that children breast fed for longer ( $\geq 3$  months) had higher bone mass values at eight months of life. Molgaard et al. [9] also observed a direct relationship between duration of breastfeeding and bone mass in young adults aged 17 years. By contrast, Pirila et al. [14] found that males breast fed for less than three months had higher BMC and BMD at 32 years of age than males breast fed for longer periods (greater than seven months). One explanation for this finding is that in the first six months of life, the level of calcium present in breast milk is relatively constant, falling by 20-30% when lactation continues beyond the sixth month [24]. From the sixth month, if the child does not have a nutritionally sufficient and adequate supplementary diet, the calcium level in breast milk may be insufficient to promote normal growth and bone development. In addition, intestinal absorption and urinary excretion of calcium may be positively or negatively

affected by other types of milk consumed, impairing the bone mineralization process [25].

It is noteworthy that although the studies included in this review were conducted in high-income countries, the different contexts between these countries may have attributed to the inconsistent associations found. Studies observing a positive association between breastfeeding and bone mass were conducted in countries where the practice of breastfeeding is known to be more commonplace, such as Denmark and Australia [6,9]. Conversely, in countries where the practice is stymied culturally, a negative or absence of association was observed [10,12,15].

A notable limiting factor of this review was the lack of homogeneity in the approach adopted for assessing breastfeeding among the selected studies. This aspect precluded the determination of an overall measurement of the effect of breastfeeding on bone mass from a meta-analysis. Another relevant limitation was that the studies controlled for different confounding factors which, to some degree, hampered comparison of the findings. A negative yet important aspect concerns the low number of studies providing data stratified by gender. Boys and girls are known to reach peak bone mass at different ages, with differences most marked during the prepubertal stage [1,26,27].

However, it is important to point out that this review was performed systematically by two authors independently using a broad set of key-words and no limitations on publication date. Of the studies included, most were longitudinal in design, strengthening the causality relationship of the associations found while lowering the chance of the reverse causality inherent to cross-sectional studies [1,27]. In addition, the review included studies assessing bone mass using DXA, considered the gold standard for measuring BMC/BMD by the *International Society for Clinical Densitometry* [28]. This inclusion of studies that only employed DXA for assessing bone mass ensured high validity and comparability of the BMC/BMD measurements collected by the studies. Also, the methodological assessment of the articles included in this review suggested they are of sufficient quality, i.e. have high internal validity.

## **Conclusions**

In conclusion, the results of the present review were conflicting across the different age groups. Analysis of the results stratified by age group revealed a lack of consensus among the studies assessing outcome in infancy; evidence of a positive effect of breastfeeding on bone mass measurements in adolescence; and a failure to reach a conclusion regarding the effect in adulthood, given that only one such study was included in the review and that effects were observed only among men. Taken together, these results suggest that breastfeeding exerts a greater effect in the long-term, particularly in adolescence, a phase during which around 90% of peak bone mass is attained [29]. In view of the small number of studies supporting these conclusions, further studies are needed, particularly among low-middle income countries. This information is fundamental, not only to inform policies on feeding and nutrition during infancy and adolescence, but also for policies for reducing chronic diseases in adulthood.

### **List of abbreviations**

BMC: bone mineral content; BMD: bone mineral density; DXA: Dual-energy x-ray absorptiometry; LILACS: Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde; WoS: Web of Science; EBF: exclusive breastfeeding.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Authors' contributions**

LCM and RB were responsible for the systematic review, data compilation and drafted the manuscript. FCW, AMBM and MCFA guided every step and critically reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **References**

1. Cooper C, Westlake S, Harvey N, Javaid K, Dennison E, Hanson M: **Review: developmental origins of osteoporotic fracture.** *Osteoporos Int* 2006, **17**(3):337-347.

2. Cooper C, Cawley M, Bhalla A, Egger P, Ring F, Morton L, et al: **Childhood growth, physical activity and peak bone mass in women.** *J Bone Miner Res* 1995, **10**:940-7.
3. Cooper C, Fall C, Egger P, Hobbs R, Eastell R, Barker D: **Growth in infancy and bone mass in later life.** *Ann Rheum Dis* 1997, **56**:17-21.
4. Kuh D, Ben-Shlomo Y: **A life course approach to chronic disease epidemiology.** *New York: Oxford University Press*, 2004.
5. Andres A, Casey PH, Cleves MA, Badger TM: **Body fat and bone mineral content of infants fed breast milk, cow's milk formula, or soy formula during the first year of life.** *J Pediatr* 2013, **163**(1):49-54.
6. Foley S, Quinn S, Jones G: **Tracking of bone mass from childhood to adolescence and factors that predict deviation from tracking.** *Bone* 2009, **44**(5):752-7.
7. Jones G, Riley M, Dwyer T: **Breastfeeding in early life and bone mass in prepubertal children: a longitudinal study.** *Osteoporos Int* 2000, **11**(2):146-52.
8. Jones G, Hynes KL, Dwyer T: **The association between breastfeeding, maternal smoking in utero, and birth weight with bone mass and fractures in adolescents: a 16-year longitudinal study.** *Osteoporos Int* 2013, **24**:1605-1611.
9. Molgaard C, Larnkjaer A, Mark AB, Michaelsen KF: **Are early growth and nutrition related to bone health in adolescence? The Copenhagen Cohort Study of infant nutrition and growth.** *Am J Clin Nutr* 2011, **94**(Suppl 6):1865S-9S.
10. Butte NF, Wong WW, Hopkinson JM, O'Brian Smith E, Ellis KJ: **Infant feeding mode affects early growth and body composition.** *Pediatrics* 2000, **106**(6):1355-1366.
11. Fewtrell MS, Kennedy K, Murgatroyd PR, Williams JE, Chomtho S, Lucas A: **Breast-feeding and formula feeding in healthy term infants and bone health at age 10 years.** *Br J Nutr* 2013, **110**(6):1-7.

12. Harvey NC, Robinson SM, Crozier SR, Marriott LD, Gale CR, Cole ZA, et al: **Breast-feeding and adherence to infant feeding guidelines do not influence bone mass at age 4 years.** *Br J Nutr* 2009, **102**(6):915-20.
13. Park MJ, Namgung R, Kim DH, Tsang RC: **Bone mineral content is not reduced despite low vitamin D status in breast milk-fed infants versus cow's milk based formula-fed infants.** *J Pediatr* 1998, **132**(4):641-5.
14. Pirila S, Taskinen M, Viljakainen H, Kajosaari M, Turanlahti M, Saarinen-Pihkala UM, et al: **Infant milk feeding influences adult bone health: a prospective study from birth to 32 years.** *PLoS One* 2011, **6**(4):e19068.
15. Young RJ, Antonson DL, Ferguson PW, Murray ND, Merkel K, Moore TE: **Neonatal and infant feeding: Effect on bone density at 4 years.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005, **41**(1):88-93.
16. Ravelli AC, van der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP: **Infant feeding and adult glucose tolerance, lipid profile, blood pressure, and obesity.** *Arch Dis Child* 2000, **82**(3):248-252.
17. World Health Organization: **WHO Scientific Group on the Assessment of Osteoporosis at Primary Health Care Level.** In *Book WHO Scientific Group on the Assessment of Osteoporosis at Primary Health Care Level.* Geneva: World Health Organization; 2007.
18. Downs SH, Black N: **The feasibility of creating a checklist for the assessment of the methodological quality both of randomised and non-randomised studies of health care interventions.** *J Epidemiol Community Health* 1998, **52**:377-84.
19. Fewtrell, M: **Early nutritional predictors of long-term bone health in preterm infants.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011, **14**(3):297-301.
20. Ong KK, Preece MA, Emmett PM, Ahmed ML, Dunger DB, ALSPAC Study Team: **Size at birth and early childhood growth in relation to maternal smoking, parity and infant breast-feeding: Longitudinal birth cohort study and analysis.** *Pediatr Res* 2002, **52**(6):863-7.

21. Prentice A: **Micronutrients and the bone mineral content of the mother, fetus and newborn.** *J Nutr* 2003, **133**(5 Suppl 2):1693S-9S.
22. Bates CJ, Prentice A: **Breast milk as a source of vitamins, essential minerals and trace elements.** *Pharmacol Ther* 1994, **62**:193-220.
23. Morley R, Lucas A: **Influence of early diet on outcome in preterm infants.** *Acta Paediatr* 1994, **405**:123-6.
24. Prentice A, Jarjou LM, Cole TJ, Stirling DM, Dibba B, Fairweather-Tait S: **Calcium requirements of lactating Gambian mothers: Effects of a calcium supplement on breast-milk calcium concentration, maternal bone mineral content, and urinary calcium excretion.** *Am J Clin Nutr* 1995, **62**:58-67.
25. Prentice A: **Diet, nutrition and osteoporosis.** *Public Health Nutrition* 2004, **7**:237-254.
26. Baroncelli GI, Saggese G: **Critical ages and stages of puberty in the accumulation of spinal and femoral bone mass: the validity of bone mass measurements.** *Hormone research* 2000, **54**(Suppl 1):2-8.
27. Grimes DA, Schulz KF: **Cohort studies: marching towards outcomes.** *Lancet* 2002, **359**(9303):341-345.
28. Lewiecki EM, Watts NB, McClung MR, Petak SM, Bachrach LK, Shepherd JA et al: **Official positions of the international society for clinical densitometry.** *J Clin Endocrinol Metab* 2004, **89**(8):3651-3655.
29. Heaney RP, Abrams S, Dawson-Hughes B, Looker A, Marcus R, Matkovic V, et al: **Peak bone mass.** *Osteoporos Int* 2000, **11**(12):985-1009.

### **Figure legends**

Figure 1 **Short title:** Systematic review's flow chart. **Detailed legend:** Systematic review's flow chart of articles assessing the association between breastfeeding and bone mass measured by DXA at different ages. September, 2014.

**Table 1** Criteria for evaluation adapted from Downs & Black.

Criteria
1. Is the hypothesis/aim/objective of the study clearly described?
2. Are the main outcomes to be measured clearly described in the Introduction or Methods section?
3. Are the characteristics of the subjects included in the study clearly described? *
4. Are the interventions of interest clearly described? **
5. Are the distributions of principal confounders in each group of subjects to be compared clearly described?
6. Are the main findings of the study clearly described?
7. Does the study provide estimates of the random variability in the data for the main outcomes?
8. Have all important adverse events that may be a consequence of the intervention been reported? **
9. Have the characteristics of subjects lost to follow-up (refusals) been described? *
10. Have 95% confidence intervals and/or p values been reported for the main outcomes, except where the p value is less than 0.001? *
11. Were the subjects asked to participate in the study representative of the entire population from which they were recruited?
12. Were those subjects who were prepared to participate representative of the entire population from which they were recruited? **
13. Were the staff, places, and facilities where the patients were treated, representative of the treatment the majority of patients receive? **
14. Was an attempt made to blind study subjects to the intervention they have received? **
15. Was an attempt made to blind those measuring the main outcomes of the intervention? **
16. If any of the results of the study were based on “data dredging”, was this made clear?
17. In trials and cohort studies, do the analyses adjust for different lengths of follow-up of patients, or in case-control studies, is the time period between the intervention and outcome the same for cases and controls? **
18. Were the statistical tests used to assess the main outcomes appropriate?
19. Was compliance with the intervention/s reliable? **
20. Were the main outcome measures used accurate (valid and reliable)?
21. Were the groups to be compared recruited from the same population? *
22. Were the study subjects recruited over the same period of time? *
23. Were study subjects randomised to intervention groups? **
24. Was the randomised intervention assignment concealed from both patients and health care Staff until recruitment was complete and irrevocable? **
25. Was there adequate adjustment for confounding in the analysis from which the main findings were drawn?
26. Were losses of subjects to follow-up taken into account? *
27. Did the study have sufficient power to detect a clinically important effect where the probability value for a difference being due to chance is less than 5%?

\* Questions adapted for observational studies;

\*\* Questions disregarded in this assessment by not apply to observational studies.

**Table 2** Characteristics of studies included in the systematic review (n=11).

Author Place/Year Score*	Design studies	Age**	Sex	N	Exposure	Outcome	Association	Statistics	Adjustment
<i>Papers evaluating children</i>									
Park <sup>13</sup> Korea 1998 <b>10*</b>	Cross-sectional	2-5 months	Both	35 18 BF 17 FF	Exclusive BF (from birth to 5 months)	BMC and BMD spine	No	Multiple regression	Age and body weight
Butte <sup>10</sup> US 2000 <b>13*</b>	Cohort	0.5, 12 and 24 months	Both	76 40 BF 36 FF	Exclusive BF (from birth to 4 months) Duration of BF	BMC whole body	Yes (-)	Pearson correlation and linear regression	Current weight and length
Jones <sup>7</sup> Australia 2000 <b>16*</b>	Cohort	8 years	Both	330 175 BF 151 FF	BF (no, yes) Duration of BF (not, less than 3 months, 3 months or larger)	BMC and BMD whole body, spine, femoral neck	Yes (+)	Multiple linear regression	Sex, current weight and length, age solids introduced, sports participation, sunlight exposure and current calcium intake
Young <sup>15</sup> EUA 2005 <b>10*</b>	Cohort	4 years	Both	178 57 BF 121 FF	Exclusive BF (from birth to 4 months)	BMC and BMD whole body	No	Analysis of variance	Crude

\*Score by Downs & Black. \*\*Age outcome. BF: breastfeeding. FF: formula-feeding. aBMD: areal bone mineral density (g/cm<sup>2</sup>).

Continuation

Author Place/Year Score*	Design studies	Age**	Sex	N	Exposure	Outcome	Association	Statistics	Adjustment
<i>Papers evaluating children</i>									
Harvey <sup>12</sup> UK 2009 <b>16*</b>	Cohort	4 years	Both	599	Duration of BF (never tried, <1 month, 1-3 months, 4-6 months, 7-11 months, 12 months or more)	BMC and BMD whole body	No	Correlation and linear regression	Bone area, weight, height, childhood milk intake, maternal birth weight, social class, mother's prudent diet score, parity, physical activity, body build (triceps skinfold thickness) and smoking
Andres <sup>5</sup> EUA 2013 <b>15*</b>	Cohort	3, 6, 9 and 12 months	Both	207	BF (no, yes)	BMC whole body, spine, femoral neck	Yes (+)	Logistic regression	Age, sex, race, gestational age, birth weight, birth length, food history and socioeconomic status of the mother

\*Score by Downs & Black. \*\*Age outcome. BF: breastfeeding. FF: formula-feeding. aBMD: areal bone mineral density (g/cm<sup>2</sup>).

Continuation

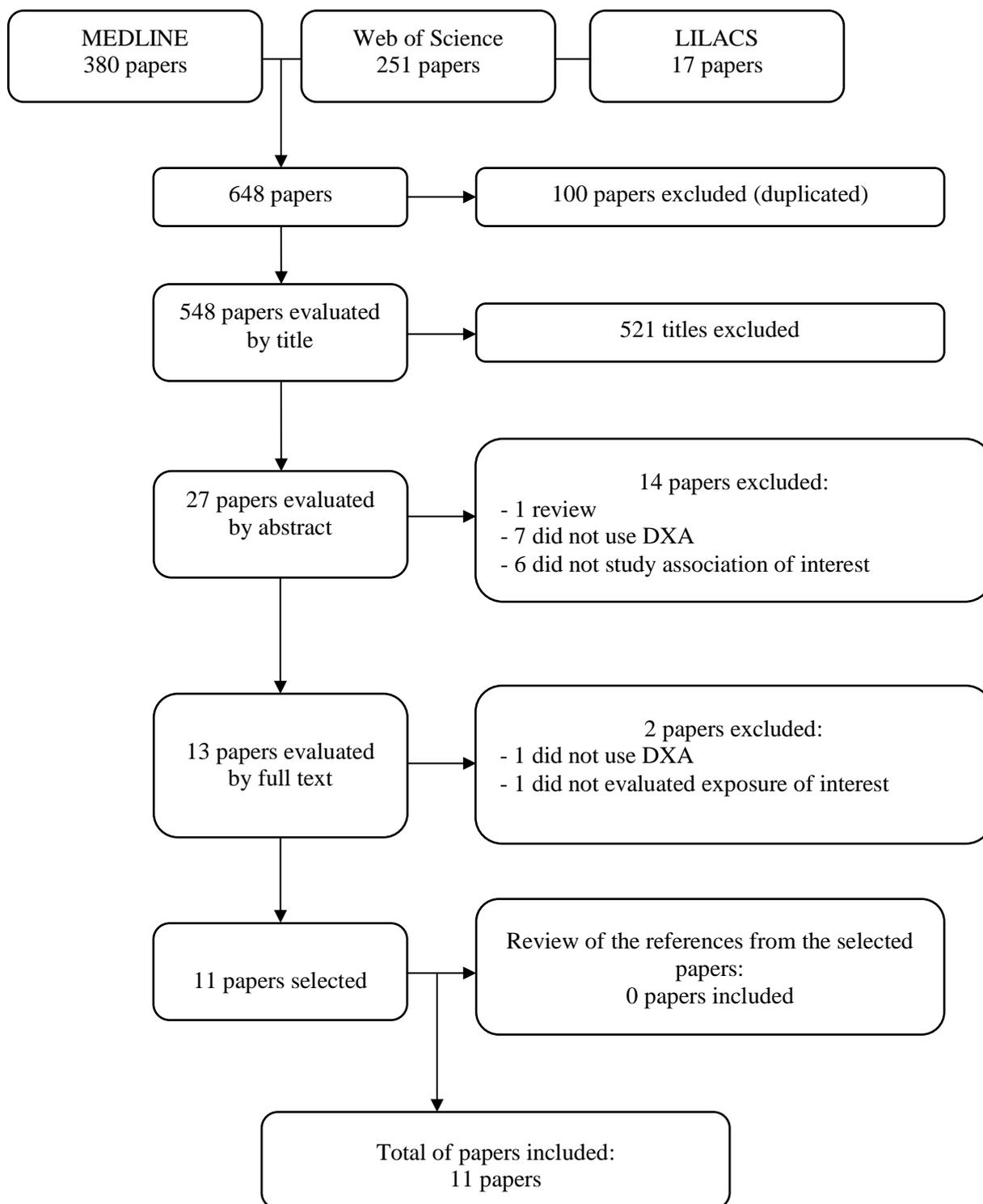
Author Place/Year Score*	Design studies	Age**	Sex	N	Exposure	Outcome	Association	Statistics	Adjustment
<i>Papers evaluating adolescents</i>									
Foley <sup>6</sup> Australia 2009 <b>15*</b>	Cohort	16 years	Both	183	BF (no, yes) reported by the mother approximately 1 month after birth	BMC and aBMD whole body and spine	Yes (+)	Logistic regression	Age, weight and height
Molgaard <sup>9</sup> Denmark 2011 <b>15*</b>	Cohort	17 years	Both	109	Duration of exclusive BF and any BF up to 9 months. If the infants were breastfed at least once a day, they were classified as breastfed	BMC and BMD whole body and spine	Yes (+)	Correlation	Sex, weight and height
Fewtrell <sup>11</sup> UK 2013 <b>16*</b>	Cohort	10 years	Both	323 120 BF 203 FF	Exclusive BF (from birth to 12 weeks)	BMC and BMD whole body and spine	No	Multiple regression	Sex, age, pubertal stage, weight, height, current physical activity and calcium intake
Jones <sup>8</sup> Australia 2013 <b>16*</b>	Cohort	16 years	Both	415	BF at 1 month (no, yes) and BF at 3 months (no, yes) Duration of BF (never, <25 days and ≥ 25 days)	BMD whole body and spine	Yes (+)	Multivariable linear regression	Sex, age, current weight and height

\*Score by Downs & Black. \*\*Age outcome. BF: breastfeeding. FF: formula-feeding. aBMD: areal bone mineral density (g/cm<sup>2</sup>).

*Continuation*

Author Place/Year Score*	Design studies	Age**	Sex	N	Exposure	Outcome	Association	Statistics	Adjustment
<i>Papers evaluating adults</i>									
Pirilä <sup>14</sup> Finland 2011 <b>15*</b>	Cohort	32 years	Both	158	Duration BF from birth to 12 months (short BF ≤3 mo; intermediate BF >3 but <7 mo and prolonged BF ≥7 mo)	BMC and BMD whole body, spine and femoral neck	Yes (-) only in men	Multivariate analysis of covariance	Gender, dietary intake of calcium, teen-age and current physical activity, smoking history, alcohol consumption, pregnancies, fractures, weight, height, BMI, weight changes during adult life and birth weight

\*Score by Downs & Black. \*\*Age outcome. BF: breastfeeding. FF: formula-feeding. aBMD: areal bone mineral density (g/cm<sup>2</sup>).



**Figure 1**

## **2. Artigo original 1**

---

Aceito para publicação pela revista *PLOS ONE*.

**Breastfeeding and bone mass at the ages of 18 and 30: prospective analysis of live births from the Pelotas (Brazil) 1982 and 1993 cohorts**

**Authors:**

Ludmila Correa Muniz<sup>1</sup>, Ana Maria Baptista Menezes<sup>1</sup>, Maria Cecília Formoso Assunção<sup>1</sup>, Fernando Cesar Wehrmeister<sup>1</sup>, Jeovany Martínez-Mesa<sup>1</sup>, Helen Gonçalves<sup>1</sup>, Marlos Rodrigues Domingues<sup>2</sup>, Denise Petrucci Gigante<sup>1</sup>, Bernardo Lessa Horta<sup>1</sup>, Fernando C. Barros<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Post-Graduate Program in Epidemiology. Federal University of Pelotas. Brazil.

<sup>2</sup> Post-Graduate Program in Physical Education. Federal University of Pelotas. Brazil.

**Corresponding author:**

Ludmila Correa Muniz

e-mail: [ludmuniz@yahoo.com.br](mailto:ludmuniz@yahoo.com.br)

Post-Graduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas. Brazil.

Rua Marechal Deodoro 1160 (3º andar). CEP: 96020-220. Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Phone: +55 (53) 3284-1302 Fax: +55 (53) 3284-1300

**Author contributions**

Design: all authors; Data collection LCM, JMM and FCW; Statistical analyses: LCM; First draft of manuscript: LCM. Revisions of different versions of the manuscript: all authors. All authors read and approved the final manuscript.

**Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## **Abstract**

**Objective:** To evaluate the effect of total breastfeeding, breastfeeding duration and type of breastfeeding at 3 months of age on bone mass at 18 and 30 years.

**Study design:** A prospective, longitudinal study was conducted with two birth cohorts (1982 and 1993) in Pelotas, Southern Brazil. Measurements of bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD) at 18 and 30 years of age were obtained by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). Information on breastfeeding was collected during the first 4 years of life. Analyses were performed by linear regression and stratified by sex.

**Results:** A total of 1109 and 3226 participants provided complete information on breastfeeding in early life and bone mass at 18 and 30 years, respectively. No association between breastfeeding and bone mass was observed in women at both ages nor among men at age 30. Among men at the age of 18, BMC and BMD were higher among those breastfed regardless of duration ( $p=0.032$  and  $p=0.043$ , respectively).

**Conclusions:** Despite a very weak positive effect of breastfeeding (yes/no) on BMC and BMD at age 18 in men, most findings pointed to a lack of association between breastfeeding and bone mass until young adulthood.

**Keywords:** Absorptiometry; breastfeeding; bone mass; cohort studies.

## **Introduction**

Osteoporosis is a leading cause of morbidity and mortality worldwide, particularly because of its association with bone fractures later in life (1-3). Bone density, a major predictor of fractures, is a result of the balance between the amount of bone mass gained earlier in life (peak bone mass) and subsequent bone loss (4).

Many genetic and environmental factors have been suggested as determinants of peak bone mass, which is attained between late adolescence and early adulthood (5, 6). During the life-course, early eating patterns such as breastfeeding, may also influence the accumulation and subsequent preservation of bone mass (7-9). The plausibility for a protective effect of breast milk has been described as a consequence of increased bioavailability and absorption of nutrients such as calcium and phosphorus, when compared to other types of milk (10). Another suggested mechanism is the potentiation effect of human milk on bone development, which may be due to the presence of some non-nutritional components, such as growth factors and hormones (11). Furthermore, early exposure to breast milk, even if for short periods, could lead to changes in the programming of bone cells, resulting in increased bone mass later in life (12).

Despite these benefits, the literature has presented conflicting results regarding the short- and long-term effects of breastfeeding on bone mineral content (BMC) and/or bone mineral density (BMD). Some studies have shown a positive effect of breastfeeding on bone mass in childhood and adolescence (10, 13-15), while others report lack of association or negative effects (16-20).

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of total breastfeeding, breastfeeding duration and type of breastfeeding at three months of age on BMC and BMD at 18 and 30 years, among individuals enrolled in the 1982 and 1993 Pelotas birth cohorts.

## **Methods**

### *Participants*

All live births from 1982 and 1993 of residents in the city of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil, were considered eligible for two birth cohort studies, which included 5914 and 5249 participants, respectively. Methodological details of the studies can be found elsewhere (21-23).

In the present analysis, all participants of the 1982 birth cohort and young adults from a subsample of the 1993 cohort who had complete data on breastfeeding in the first four years of life were included. The subsample from the 1993 cohort included all low birth weight children (<2500g), plus a random sample of 20% of the remaining original cohort (23, 24) (Fig 1).

All follow-ups of the Pelotas Birth Cohorts were granted approval from the local Ethics Committee. At all stages, the participants (or their legal guardians) signed an informed consent form.

### *Breastfeeding assessment*

Breastfeeding information was obtained prospectively during the first four years of life, by home interviews with mothers. In our analysis, breastfeeding was included as a dichotomous variable (yes/no); and as an ordinal variable, in which the total duration of breastfeeding, whether exclusive, predominant or partial, was categorized in months (never; 0.01-1.00; 1.01 to 3.00; 3.01- 6.00; 6.01 to 12.00; and > 12.00). The pattern of breastfeeding at three months of age was classified into four groups: "exclusive" (children who received only breast milk and no other liquid or solid foods); "Predominant" (children who received liquids other than breast milk, such as water and

other water-based liquids such as fruit juice or tea); "Partial" (children who received, in addition to breast milk, food supplements with other types of milk, such as cow's milk or formulas, or semi-solid / solid food) and "weaned" (children who did not receive breast milk) (25). For the analysis, and due to the small number of observations, we chose to combine the categories "exclusive" and "predominant" (few children were exclusively breastfed at three months of age).

#### *Bone mineral content and density*

Our outcomes, whole body BMC (g) and BMD ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) were assessed at the time of follow-ups at ages 18 and 30, in the 1993 and 1982 birth cohorts, respectively. Both measures were obtained by Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA) (Lunar Prodigy Advance - GE®, Germany) (26) and analyzed continuously. Participants presenting any of the following exclusion criteria were not examined: pregnancy or suspected pregnancy; individuals in wheelchairs; with osteo-articular disabilities; wearing non-removable metallic objects (e.g. screws, earrings or piercings); and extremely obese individuals (weight exceeding 120 kg) or those taller than 192 cm (Fig 1).

#### *Covariates*

The following variables from the perinatal studies were used as potential confounders: family income (minimum wages); maternal education (years of schooling); maternal age (years); maternal skin color; maternal smoking during pregnancy; parity (number of previous children); gestational age at birth (weeks); birth weight (grams); and skin color. Further information about z-scores of height-for-age at 12 months (cohort 1993) and 24 months (cohort 1982) were used, according to World

Health Organization for children under five (27). Analysis on both cohorts were also adjusted for total physical activity (minutes/week); the 1993 cohort was additionally adjusted for calcium intake (mg/day adjusted for total calories) at 18 years; this latter variable was not available for the 1982 cohort. All analyses were adjusted for height and weight at the age of 18 (1993 cohort) and 30 (1982 cohort), because body size is highly correlated with bone mass.

### *Statistical analyses*

Statistics were performed using the *Stata* 12.1 (Stata Corp., College Station, Texas, EUA) software package and stratified by sex, given the evidence suggesting gender differences in bone mass accumulation (28, 29). Descriptive analyses were performed using absolute and relative frequencies for categorical variables and mean and standard deviations (SD) for numeric variables (median and interquartile range for asymmetric variables). Mean and SD of outcomes according to main exposures were obtained by analysis of variance (ANOVA) or the Kruskal-Wallis test. In unadjusted and adjusted analysis, the  $\beta$  coefficients, 95% confidence intervals (95% CI) and p-values of the Wald's test for heterogeneity were obtained by linear regression. When adjusting for potential confounders, the variables were included in the regression following a complete fit model, regardless of their significance level with the outcome of the bivariate analysis. Results related to the 1993 birth cohort were weighted to match the proportion of low birth weight in the overall population from the perinatal study.

## **Results**

Out of the 5332 participants in the 1982 cohort and 1440 young adults in the subsample of the 1993 cohort, for whom information on maternal breastfeeding in the first four years of life was available, 3226 and 1109 had undergone full body scans at 30 and 18 years of age, respectively, and were included in the analyses. Table 1 shows that, among those born in 1982, there was no statistically significant difference in most variables between participants included in the analyses and individuals not assessed (N=2106). However, a greater proportion of individuals with a family income of less than or equal to three minimum wages (69.9% versus 68.0%), a lower percentage of male participants (47.9% versus 56.5%) and of premature newborns (5.5% versus 5.6%) and lower mean weight ( $74.4 \pm 15.7$  kg versus  $96.7 \pm 29.1$  kg) and height at 30 years of age ( $1.67 \pm 0.09$  m versus  $1.71 \pm 0.11$  m) was observed in individuals assessed than in those not included in the analyses. Among the participants in the 1993 cohort, a lower mean weight ( $65.3 \pm 13.9$  kg versus  $81.5 \pm 28.5$  kg) was seen in participants included in the analyses than in individuals not assessed (N=331). Moreover, the young adults were more physically active ( $671.9 \pm 754.7$  min/week versus  $470.0 \pm 567.1$  min/week).

Among those born in 1982 and 1993, females accounted for 52.1% and 50.2% of the samples, respectively, and had lower BMC and BMD when compared to males: mean BMC and BMD at 30 years was  $2544.6 \pm 391.6$ g and  $1.165 \pm 0.08$ g/cm<sup>2</sup> in women versus  $3195.4 \pm 466.4$ g and  $1.274 \pm 0.10$ g/cm<sup>2</sup> in men, respectively, while mean values of BMC and BMD at 18 years were  $2411.65 \pm 404.6$ g and  $1.135 \pm 0.08$ g/cm<sup>2</sup> in women versus  $2947.9 \pm 468.2$ g and  $1.222 \pm 0.10$ g/cm<sup>2</sup> in men, respectively (p <0.001 for both outcomes and studies) (Table 2).

With respect to the exposures of interest, among those born in 1982, around 8.0% were not breastfed (7.6% of girls and 8.1% of boys) whereas among those born in 1993, 5.0% of the sample never received breast milk (2.8% of girls and 4.4% of boys).

At three months, 47.2% of births in 1982 and 40.1% of those born in 1993 had already been weaned. The median total duration of breastfeeding was 3.0 months [25<sup>th</sup> Percentile (P25): 1.0 – 75<sup>th</sup> Percentile (P75): 6.0] among boys and 3.0 months (P25: 1.0 - P75: 7.0) among girls born in 1982 compared with 3.0 months (P25: 1.5 - P75: 8.0) among boys and 3.5 months (P25: 1.5 - P75 12.0) among girls born in 1993.

Table 2 presents the descriptive analysis of outcomes according to breastfeeding variables, stratified by sex, for both studies. Among men, the variables full breastfeeding in months and pattern of breastfeeding at three months, were associated with both outcomes at 30 years of age. When bone mass was assessed at 18 years, only total breastfeeding (in months) was associated with BMD ( $p=0.027$ ), but with no dose-response effect. Among women, no breastfeeding variables were associated with outcomes assessed at 30 years of age; however at the age of 18, women who had been breastfed, regardless of duration, had higher BMC compared to those who were never breastfed ( $p=0.025$ ).

Table 3 displays the crude and adjusted coefficients of the associations between breastfeeding and BMC at 18 and 30 years for men and women. No evidence was observed between breastfeeding variables and BMC in women in both studies. Among men, higher values of BMC were observed at age 18 among those who had been breastfed for any period of time compared to those never breastfed (crude and adjusted analyses). Also among males, the total maternal breastfeeding variable in months was associated, in the crude analysis only, with BMC at 18 and 30 years, although the association did not exhibit a tendency pattern. Higher BMC at 30 years was also observed among men exclusively/predominantly fed maternal milk up to the third month of life, compared to those who had already been weaned. However, this effect disappeared after adjusting for confounding factors.

Table 4 presents the crude and adjusted coefficients of the association between breastfeeding variables and BMD at 18 and 30 years, stratified by sex. In females, only categorical breastfeeding in months showed an association with BMD at the age of 18. However, the effect was lower and statistical significance was no longer observed after adjusting for potential confounders. In men, as observed for BMC, only crude analysis resulted in statistically significant associations between categorical breastfeeding and BMD at 30 years. Among men aged 18 years, using dichotomous breastfeeding, both crude and adjusted analyses showed that BMD was higher among those who had been breastfed. When analyzing total breastfeeding (in months), similar results for BMC were observed. A higher BMD at 18 years was found among men breastfed for less than one month ( $\beta$  crude=0.051 95%CI 0.016; 0.087) and from 6.01 to 12 months ( $\beta$  crude=0.060 95%CI 0.023; 0.097) compared to those not breastfed, where this effect disappeared after adjusting for confounders.

## **Discussion**

Current evidence shows that the effect of breastfeeding on bone mass may extend beyond childhood, in accordance with Barker's hypotheses (13, 20). With respect to the main results of our study, after adjusting for potential confounders, we failed to detect any effect from the exposure to breast milk on bone health of women in both the cohorts or in men at 30 years of age. In males, only the maternal breastfeeding variable (yes/no) was associated with bone mass at 18 years of age, with greater BMC and BMD at 18 years observed among those who had been breastfed for any length of time compared to those never breastfed.

However, exposure to breast milk at least once in a lifetime was enough to classify the individual as breastfed, which is a weakness of this variable; thus, the positive effect observed in males should be interpreted with caution.

Although the effects of early dietary exposures on body composition in later life are well described in the literature, the relationship between breastfeeding and bone mineral mass is still poorly understood. Only two studies indicated a positive effect of breastfeeding on bone health in late adolescence (13, 15). Jones et al., (13) evaluated 415 adolescents (16 years) from a Tasmanian cohort. The study showed that infants who were born full-term and breastfed had higher BMD (whole body, lumbar spine lumbar and femoral neck) compared to non-breastfed infants, and larger effects were observed among those breastfed for longer (above three months). In the study by Molgaard et al., (15) the authors also observed a direct relationship between the duration of breastfeeding and bone mass at 17 years of age. Both studies indicated a dose-response relationship between breastfeeding length and bone mass, in contrast with that observed in the present study. Several hypotheses have been postulated to explain the beneficial effect of breastfeeding and prolonged breastfeeding. The most common theory implicates greater bioavailability and absorption of calcium and phosphorus in human milk compared to other types of milk (10). Moreover, the consumption of breast milk results in an average intake of 200mg of calcium per day (30, 31), sufficient to promote good skeletal development in childhood, which can be observed later in life (32). Also, the presence of hormones and growth factors in human milk may enhance its effect on bone development (11) while early and prolonged exposure to breast milk may lead to changes in the programming of bone cells, resulting in long-term increased bone mass (12).

As previously mentioned, the studies that found an association between breastfeeding and bone mass (13, 15) reported positive effects of breast milk in both men and women. In the present study, no effect of breastfeeding was observed on BMC and BMD in women at 18 and 30 years of age. In this regard, some authors have suggested that among women, unlike men, hormonal factors, lifestyle, such as smoking, physical activity, calcium intake and body composition are more important for bone health than early dietary characteristics such as breastfeeding (33). In an attempt to test this hypothesis, adjustments to mediators such as physical activity level, daily calcium intake, and body mass index at 18 and 30 years of age were made. However, after these adjustments results were unchanged. Other analyses were also performed to elucidate the lack of association among women. Initially, we assumed that as men are taller than women (about 1.61m and 1.74 m, respectively, in both studies,  $p < 0.001$ ; data not shown) and given that bone mass correlates with height, this could be an explanation for the observed difference between sexes regarding breastfeeding and bone mass. However, the height of the participants did not differ according to breastfeeding variables and was not identified as a mediator of the relationship between breastfeeding and bone mass. In conclusion, we could not fully explain the differences between men and women and cannot rule out the possibility that the positive results observed in men at the age of 18 were due to chance.

A limitation of this study was that exclusive breastfeeding was not analyzed dichotomously. However, we chose not to use the dichotomous variable because, at the time of the studies, the policy on breastfeeding in Brazil was nonexistent or relatively recent (34) and the median length of exclusive breastfeeding among children from the 1982 and 1993 Pelotas birth cohorts was less than a week (35). Another reason for not using the dichotomous variable was owing to the small percentage of participants in the

1993 cohort exclusively breastfed at three months of age (only 7.0%), a much lower proportion than for those born in 1982. Consequently, a cut-off point of three months was adopted for the pattern of breastfeeding variable.

Another limitation of the present study was the lack of adjustment for daily calcium intake at 30 years in the 1982 cohort, because this information was unavailable. This latter factor may represent a significant limitation to elucidating the relationship between breastfeeding and bone mass at 30 years of age, given that calcium is a key nutrient for the formation and subsequent maintenance of bones.

Furthermore, the fact that only one subsample of the 1993 cohort was analyzed may also be regarded as a limitation of the study, in as far as a smaller sampling size may have impacted the power of the study; however, the results obtained from the subsample proved similar to those observed for the 1982 cohort which included all the participants.

On the other hand, the positive aspects of this study hinge on the prospective nature of data collection, for both exposures and confounders, thus ruling out recall bias. Another strength of this study was that measures of BMC and BMD were obtained via DXA, considered the gold standard by the International Society for Clinical Densitometry (36) to assess bone mass. Another important characteristic was the age at which the outcome was measured, as most studies published to date have evaluated bone mass during childhood (10, 16, 17). If bone mass is measured in late adolescence, a period when many intense and rapid body changes occur impacting body composition in adulthood (37), then this allows the assessment of whether the effects of early nutrition extend beyond childhood.

## **Conclusions**

The present study investigated the effect of breastfeeding on BMC and BMD assessed by DXA, a technique considered the gold standard for assessing bone mass in two birth cohorts.

Although a very weak positive association was observed for the variable breastfeeding (yes or no) among men at 18 years old, these results were not consistent between the two periods; most of the findings from this study failed to show a direct association between breastfeeding and long-term effects on bone mass.

### **Acknowledgements**

This article is based on data from the studies "Pelotas Birth Cohort, 1982 and 1993" conducted by the Postgraduate Program in Epidemiology at the Universidade Federal de Pelotas. The 1982 and 1993 birth cohort studies are currently supported by Wellcome Trust. The International Development Research Center, the World Health Organization, Overseas Development Administration, European Union, National Support Program for Centers of Excellence (PRONEX), the Brazilian National Research Council (CNPq), the Brazilian Public Health Association (ABRASCO) and the Brazilian Ministry of Health supported previous phases of the studies. The aforementioned funders had no role in the design, analysis or writing of this article.

### **References**

1. Marshall D, Johnell O, Wedel H (1996) Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fracture. *BMJ* 312:1254-59.
2. Nguyen T, Sambrook P, Kelly PJ, Jones G, Lord S, Freund J, et al. (1993) Prediction of osteoporotic fractures by postural instability and bone density. *BMJ* 307:1111-15.

3. Torgerson DJ, Iglesias CP, Reid DM 2011 The economics of fracture prevention. In *The Effective Management of Osteoporosis* 111-121 [DH Barlow, RM Francis and A Miles, editors]. Farringdon: Aesculapius Medical Press.
4. Hansen MA, Kirsten O, Riis BJ, Christiansen C 1991 Role of peak bone mass and bone loss in postmenopausal osteoporosis: 12 years study. *BMJ* 303:961-4.
5. Valimaki M, Karkkainen M, Allardt C, Laitinen K, Alhava E, Heikkinen J, et al. (1994) Exercise, smoking and calcium intake during adolescence and early adulthood as determinants of peak bone mass. *BMJ* 309:230-5.
6. Welten DC, Kemper HC, Post GB, Van Mechelen W, Twisk J, Lips P, et al. (1994) Weight-bearing activity during youth is a more important factor for peak bone mass than calcium intake. *J Bone Min Res* 9:1089-96.
7. Kuh D, Ben-Shlomo Y 2004 *A life course approach to chronic disease epidemiology*. New York: Oxford University Press.
8. Cooper C, Cawley M, Bhalla A, Egger P, Ring F, Morton L, et al. (1995) Childhood growth, physical Breastfeeding and Bone Mass in Prepubertal Children 151 activity and peak bone mass in women. *J Bone Miner Res* 10:940-7.
9. Cooper C, Fall C, Egger P, Hobbs R, Eastell R, Barker D 1997 Growth in infancy and bone mass in later life. *Ann Rheum Dis* 56:17-21.
10. Jones G, Riley M, Dwyer T (2000) Breastfeeding in early life and bone mass in prepubertal children: a longitudinal study. *Osteoporos Int* 11(2):146-52.

11. Fewtrell, M (2011) Early nutritional predictors of long-term bone health in preterm infants. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14(3):297-301.
12. Morley R, Lucas A (1994) Influence of early diet on outcome in preterm infants. *Acta Paediatr* 405:123-6.
13. Jones G, Hynes KL, Dwyer T (2013) The association between breastfeeding, maternal smoking in utero, and birth weight with bone mass and fractures in adolescents: a 16-year longitudinal study. *Osteoporos Int* 24:1605-11.
14. Foley S, Quinn S, Jones G (2009) Tracking of bone mass from childhood to adolescence and factors that predict deviation from tracking. *Bone* 44(5):752-7.
15. Molgaard C, Larnkjaer A, Mark AB, Michaelsen KF (2011) Are early growth and nutrition related to bone health in adolescence? The Copenhagen Cohort Study of infant nutrition and growth. *Am J Clin Nutr* 94(Suppl 6):1865S-9S.
16. Harvey NC, Robinson SM, Crozier SR, Marriott LD, Gale CR, Cole ZA, et al. (2009) Breast-feeding and adherence to infant feeding guidelines do not influence bone mass at age 4 years. *Br J Nutr* 102(6):915-20.
17. Young RJ, Antonson DL, Ferguson PW, Murray ND, Merkel K, Moore TE (2005) Neonatal and infant feeding: Effect on bone density at 4 years. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 41(1):88-93.
18. Fewtrell MS, Kennedy K, Murgatroyd PR, Williams JE, Chomtho S, Lucas A (2013) Breast-feeding and formula feeding in healthy term infants and bone health at age 10 years. *Br J Nutr* 110(6):1-7.

19. Butte NF, Wong WW, Hopkinson JM, O'Brian Smith E, Ellis KJ (2000) Infant feeding mode affects early growth and body composition. *Pediatrics* 106(6):1355-66.
20. Pirila S, Taskinen M, Viljakainen H, Kajosaari M, Turanlahti M, Saarinen-Pihkala UM, et al. (2011) Infant milk feeding influences adult bone health: a prospective study from birth to 32 years. *PLoS One* 6(4):e19068.
21. Araujo CL, Menezes AM, Vieira MF, Neutzling MB, Goncalves H, Anselmi L, et al. (2010) The 11-year follow-up of the 1993 Pelotas (Brazil) birth cohort study: methods. *Cad Saude Publica* 26:1875-86.
22. Victora CG, Hallal PC, Araujo CL, Menezes AM, Wells JC, Barros FC (2008) Cohort profile: the 1993 Pelotas (Brazil) birth cohort study. *Int J Epidemiol* 37:704-9.
23. Gonçalves H, Assunção MCF, Wehrmeister FC, Oliveira IO, Barros FC, Victora CG, et al. (2014) Cohort profile updated: The 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort follow-up visits in adolescence. *Int J Epidemiol*; doi: 10.1093/ije/dyu077.
24. Victora CG, Araujo CL, Menezes AM, Hallal PC, Vieira MdeF, Neutzling MB, et al. (2006) Methodological aspects of the 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. *Rev Saude Publica* 40(1): 39-46.
25. Victora CG, Matijasevich A, Santos IS, Barros, AJD, Horta BL, Barros FC (2008) Breastfeeding and feeding patterns in three birth cohorts in Southern Brazil: trends and differentials. *Cad Saude Publica* 24(Suppl 3):S409-S416.
26. Kelly TL, Wilson KE, Heymsfield SB (2009) Dual energy X-Ray absorptiometry body composition reference values from NHANES. *PLoS One* 4:e7038.

27. De Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J (2007) Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ* 85:660-7.
28. Cooper C, Westlake S, Harvey N, Javaid K, Dennison E, Hanson M (2006) Review: developmental origins of osteoporotic fracture. *Osteoporos Int* 17(3):337-47.
29. Hasselstrom H, Karlsson KM, Hansen SE, Gronfeldt V, Froberg K, Andersen LB (2006) Sex differences in bone size and bone mineral density exist before puberty. The Copenhagen School Child Intervention Study (CoSCIS). *Calcif Tissue Int* 79(1):7-14.
30. Ong KK, Preece MA, Emmett PM, Ahmed ML, Dunger DB, ALSPAC Study Team (2002) Size at birth and early childhood growth in relation to maternal smoking, parity and infant breast-feeding: Longitudinal birth cohort study and analysis. *Pediatr Res* 52:863-7.
31. Prentice A (2003) Micronutrients and the bone mineral content of the mother, fetus and newborn. *J Nutr* 133(5 Suppl 2):1693S-9S.
32. Bates CJ, Prentice A (1994) Breast milk as a source of vitamins, essential minerals and trace elements. *Pharmacol Ther* 62:193-220.
33. Wells JC (2007) Sexual dimorphism of body composition. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21(3):415-30.
34. Rea M F (2003) A review of breastfeeding in Brazil and how the country has reached ten months' breastfeeding duration. *Cad Saude Publica* 19(Suppl 1):S37-45.

35. Gonzalez-Chica DA, Goncalves H, Nazmi A, Santos IS, Barros AJD, Matijasevich A, et al. (2012) Seasonality of infant feeding practices in three Brazilian birth cohorts. *Int J Epidemiol* 41(3):743-52.
36. Lewiecki EM, Watts NB, McClung MR, Petak SM, Bachrach LK, Shepherd JA, et al. (2004) Official positions of the international society for clinical densitometry. *J Clin Endocrinol Metab* 89(8):3651-5.
37. Heaney RP, Abrams S, Dawson-Hughes B, Looker A, Marcus R, Matkovic V, et al. (2000) Peak bone mass. *Osteoporos Int* 11(12):985-1009.

### **Figure legends**

Figure 1\_ **Short title:** Flowchart. **Detailed legend:** Description of the 1982 and 1993 Pelotas Birth Cohorts. **Endnotes:** 1 Subjects excluded of DXA scan: pregnant or suspected pregnancy (n=72); individuals in wheelchairs or with osteo-articular disabilities (n=5); losses/refusals or subjects with wearing non-removable metallic objects (e.g. screws, earrings or piercings) (n=192); extremely obese individuals (n=73) or those taller than 192 cm (n=10); 2 Subjects excluded of DXA scan: pregnant or suspected pregnancy (n=60); individuals in wheelchairs or with osteo-articular disabilities (n=11); losses (n=10); subjects with wearing non-removable metallic objects (e.g. screws, earrings or piercings) (n=78); extremely obese individuals (n=14) or those taller than 192 cm (n=13).

**Table 1** Characteristics of the participants with complete data compared with participants not included in the analysis. The 1982 and 1993 Pelotas Birth Cohorts. Brazil.

Variables	1982 (N=5332)		<i>p-value</i>	1993 (N=1440)		<i>p-value</i>
	N			N		
	Mean (SD); %			Mean (SD); %		
	Participants included in the analysis N=3226	Participants excluded from the analysis <sup>1</sup> N=2016		Participants included in the analysis N=1109	Participants excluded from the analysis <sup>1</sup> N=331	
Sex	N=3226	N=2106	<0.001 <sup>3</sup>	N=1109	N=331	0.839 <sup>3</sup>
Males	47.9	56.5		49.8	50.5	
Females	52.1	43.5		50.2	49.5	
Family income (minimum wages)	N=3211	N=2098	0.010 <sup>3</sup>	N=1094	N=322	0.541 <sup>3</sup>
≤ 1	20.1	21.6		17.8	21.2	
1.1-3.0	49.8	46.4		44.3	43.1	
3.1-6.0	19.2	18.6		22.6	19.8	
>6.0	10.9	13.4		15.3	15.9	
Maternal skin color	N=3225	N=2104	0.772 <sup>3</sup>	N=1109	N=331	0.168 <sup>3</sup>
White	82.1	81.8		77.8	81.6	
Non-white	17.9	18.2		22.2	18.4	
Maternal education (years)	N=3222	N=2105	0.306 <sup>3</sup>	N=1106	N=331	0.454 <sup>3</sup>
0-4	32.4	32.5		26.3	28.8	
5-8	43.0	40.9		48.1	43.6	
9-11	10.9	11.6		17.6	17.4	
≥12	13.7	15.0		8.0	10.2	
Maternal age (years)	N=3226	N=2105	0.378 <sup>3</sup>	N=1109	N=331	0.198 <sup>3</sup>
< 20	14.8	16.2		14.4	18.6	
20-34	74.8	73.9		74.8	69.9	
> 34	10.4	9.9		10.8	11.5	

Continuation

Variables	1982 (N=5332)		<i>p-value</i>	1993 (N=1440)		<i>p-value</i>
	N			N		
	Mean (SD); %			Mean (SD); %		
	Participants included in the analysis N=3226	Participants excluded from the analysis <sup>1</sup> N=2016		Participants included in the analysis N=1109	Participants excluded from the analysis <sup>1</sup> N=331	
Maternal smoking during pregnancy	N=3226	N=2106	0.110 <sup>3</sup>	N=1109	N=331	0.354 <sup>3</sup>
No	65.5	63.4		67.6	64.7	
Yes	34.5	36.6		32.4	35.3	
Parity (number of previous children)	N=3226	N=2105	0.049 <sup>3</sup>	N=1109	N=331	0.151 <sup>3</sup>
None	39.6	38.8		33.2	37.2	
1	29.2	26.9		28.5	24.7	
2	16.1	16.6		21.3	17.1	
3	6.3	8.1		6.8	7.2	
≥4	8.8	9.6		10.2	13.8	
Gestational age at birth (weeks)	N=2597	N=1665	0.017 <sup>3</sup>	N=1104	N=328	0.723 <sup>3</sup>
< 34	0.5	0.6		1.7	2.6	
34-36	5.0	5.0		8.2	8.9	
37-40	68.0	72.1		88.0	86.5	
> 40	26.5	22.3		2.1	2.0	
Birth weight (grams)	N=3225	N=2105	0.293 <sup>3</sup>	N=1107	N=330	0.420 <sup>3</sup>
< 2500	7.1	8.3		9.9	8.1	
2500-2999	23.8	23.2		23.2	26.7	
3000-3499	38.1	38.8		41.2	40.3	
3500-3999	25.2	23.4		20.1	17.7	
≥ 4000	5.8	6.3		5.6	7.2	

Continuation

Variables	1982 (N=5332)		<i>p-value</i>	1993 (N=1440)		<i>p-value</i>
	N			N		
	Mean (SD); %			Mean (SD); %		
	Participants included in the analysis N=3226	Participants excluded from the analysis <sup>1</sup> N=2016		Participants included in the analysis N=1109	Participants excluded from the analysis <sup>1</sup> N=331	
Skin color	N=3225	N=357	0.190 <sup>3</sup>	N=1063	N=165	0.477 <sup>3</sup>
White	75.9	79.0		63.7	60.6	
Non-white	24.1	21.0		36.3	39.4	
Height-for-age at 12 months (z-score)	-	-		N=1062 -0.23 (1.25)	N=297 -0.28 (1.40)	0.812 <sup>2</sup>
Height-for-age at 24 months (z-score)	N=3055 -0.70 (1.19)	N=1876 -0.69 (1.33)	0.499 <sup>2</sup>	-	-	
Height at 18 years (m)	-	-		N=1106 1.67 (0.10)	N=37 1.71 (0.14)	0.304 <sup>2</sup>
Height at 30 years (m)	N=3222 1.67 (0.09)	N=273 1.71 (0.11)	<0.001 <sup>2</sup>	-	-	
Weight at 18 years (kg)	-	-		N=1106 65.34 (13.89)	N=37 81.50 (28.54)	0.014 <sup>2</sup>
Weight at 30 years (kg)	N=3222 74.44 (15.72)	N=217 96.71 (29.10)	<0.001 <sup>2</sup>	-	-	
Total physical activity at 18 years (minutes/week)	-	-		N=1105 671.91 (754.68)	N=70 470.04 (567.07)	0.004 <sup>2</sup>

Continuation

Variables	1982 (N=5332)		<i>p-value</i>	1993 (N=1440)		<i>p-value</i>
	N			N		
	Mean (SD); %			Mean (SD); %		
	Participants included in the analysis N=3226	Participants excluded from the analysis <sup>1</sup> N=2016		Participants included in the analysis N=1109	Participants excluded from the analysis <sup>1</sup> N=331	
Total physical activity at 30 years (minutes/week)	N=3178 300.49 (374.14)	N=311 263.67 (398.42)	0.099 <sup>4</sup>	-	-	
Calcium intake <sup>5</sup> at 18 years (mg/day)	-	-		N=1075 704.95 (350.14)	N=62 755.49 (362.11)	0.255 <sup>4</sup>

N: Number of observations; SD: standard deviation; <sup>1</sup>Participants excluded from the analysis due to loss of follow-up or missing data; <sup>2</sup>Kruskal-Wallis; <sup>3</sup>Chi-square test; <sup>4</sup>Analysis of variance; <sup>5</sup>No data for 1982 cohort study

**Table 2** Descriptive analysis of the whole body bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD) at ages 18 and 30 according to breastfeeding variables, stratified by sex. The 1982 and 1993 Pelotas Birth Cohorts. Brazil.

Variables	<i>Men</i>					
	1982			1993		
	N	Mean (SD)	BMD (g/cm <sup>2</sup> )	N	Mean (SD)	BMD (g/cm <sup>2</sup> )
	1545	3195.39 (466.37)	1.274 (0.096)	531	2947.91 (468.21)	1.222 (0.097)
Breastfeeding		<i>p=0.913<sup>1</sup></i>	<i>p=0.703<sup>1</sup></i>		<i>p=0.381<sup>2</sup></i>	<i>p=0.292<sup>2</sup></i>
No	125	3199.76 (491.30)	1.277 (0.105)	35	2803.96 (366.35)	1.196 (0.070)
Yes	1420	3195.00 (464.29)	1.274 (0.095)	496	2954.00 (471.55)	1.224 (0.098)
Total duration of breastfeeding (months)		<i>p=0.029<sup>1</sup></i>	<i>p=0.007<sup>1</sup></i>		<i>p=0.052<sup>2</sup></i>	<i>p=0.027<sup>2</sup></i>
Never	125	3199.76 (491.30)	1.277 (0.105)	35	2803.96 (366.35)	1.196 (0.070)
0.01 – 1.00	361	3145.12 (468.44)	1.261 (0.094)	95	3090.23 (540.07)	1.247 (0.108)
1.01 – 3.00	460	3195.27 (473.42)	1.274 (0.098)	160	2920.20 (429.24)	1.215 (0.088)
3.01 – 6.00	217	3164.75 (439.90)	1.269 (0.092)	93	2889.71 (453.10)	1.215 (0.093)
6.01 – 12.00	162	3271.34 (450.59)	1.290 (0.088)	59	3049.96 (489.83)	1.255 (0.102)
> 12.00	220	3249.94 (462.42)	1.286 (0.096)	76	2892.31 (452.81)	1.214 (0.099)
Pattern of breastfeeding at three months of age		<i>p=0.042<sup>1</sup></i>	<i>p=0.023<sup>1</sup></i>		<i>p=0.175<sup>1</sup></i>	<i>p=0.6320<sup>1</sup></i>
Weaning	740	3164.93 (473.37)	1.267 (0.098)	245	2977.56 (479.65)	1.222 (0.097)
Partial	395	3214.21 (465.13)	1.280 (0.095)	122	2883.66 (445.34)	1.218 (0.096)
Exclusive/predominant	410	3232.23 (452.13)	1.280 (0.094)	157	2962.30 (470.32)	1.228 (0.097)

Continuation

Variables	Women					
	1982			1993		
	N	Mean (SD) BMC (g)	BMD (g/cm <sup>2</sup> )	N	Mean (SD) BMC (g)	BMD (g/cm <sup>2</sup> )
	1681	2544.59 (391.58)	1.165 (0.078)	576	2411.65 (404.55)	1.135 (0.082)
Breastfeeding		<i>p</i> =0.262 <sup>1</sup>	<i>p</i> =0.291 <sup>1</sup>		<i>p</i> =0.025 <sup>2</sup>	<i>p</i> =0.184 <sup>1</sup>
No	128	2507.30 (384.33)	1.158 (0.076)	26	2290.12 (331.74)	1.108 (0.099)
Yes	1553	2547.67 (392.14)	1.166 (0.078)	550	2414.60 (406.12)	1.136 (0.081)
Total duration of breastfeeding (months)		<i>p</i> =0.676 <sup>1</sup>	<i>p</i> =0.732 <sup>1</sup>		<i>p</i> =0.320 <sup>1</sup>	<i>p</i> =0.219 <sup>1</sup>
Never	128	2507.30 (384.33)	1.158 (0.076)	26	2290.12 (331.74)	1.108 (0.099)
0.01 – 1.00	365	2557.23 (402.01)	1.163 (0.081)	97	2391.21 (422.21)	1.122 (0.085)
1.01 – 3.00	519	2534.08 (384.43)	1.166 (0.075)	165	2377.51 (385.50)	1.129 (0.077)
3.01 – 6.00	240	2548.04 (398.01)	1.165 (0.075)	91	2433.00 (430.85)	1.140 (0.078)
6.01 – 12.00	178	2576.78 (378.28)	1.171 (0.077)	66	2489.02 (397.23)	1.143 (0.084)
> 12.00	251	2540.87 (398.97)	1.167 (0.086)	121	2425.02 (418.22)	1.144 (0.083)
Pattern of breastfeeding at three months of age		<i>p</i> =0.287 <sup>1</sup>	<i>p</i> =0.446 <sup>1</sup>		<i>p</i> =0.583 <sup>1</sup>	<i>p</i> =0.058 <sup>1</sup>
Weaning	784	2535.16 (389.71)	1.163 (0.077)	230	2389.62 (393.36)	1.124 (0.082)
Partial	432	2535.45 (378.99)	1.166 (0.077)	158	2411.42 (389.90)	1.136 (0.075)
Exclusive/predominant	465	2569.00 (405.78)	1.168 (0.082)	184	2431.64 (432.07)	1.144 (0.086)

SD: standard deviation; <sup>1</sup>Analysis of variance; <sup>2</sup>Kruskal-Wallis

**Table 3** Crude and adjusted coefficients of the association between breastfeeding variables and whole body bone mineral content (BMC) at 18 and 30 years for men and women. The 1982 and 1993 Pelotas Birth Cohorts. Brazil.

Variables	Men			
	1982 ( $\beta$ ; 95%CI)		1993 ( $\beta$ ; 95%CI)	
	Crude	Adjusted <sup>1</sup>	Crude	Adjusted <sup>2</sup>
Breastfeeding	<i>p</i> =0.913	<i>p</i> =0.856	<i>p</i> =0.036	<i>p</i> =0.032
No	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Yes	-4.75 (-90.13; 80.62)	-6.14 (-72.49; 60.21)	150.94 (9.78; 292.11)	125.51 (11.09; 239.92)
Total duration of breastfeeding (months)	<i>p</i> =0.029	<i>p</i> =0.389	<i>p</i> =0.014	<i>p</i> =0.120
Never	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
0.01 – 1.00	-54.64 (-149.35; 40.07)	-24.08 (-98.22; 50.07)	287.77 (105.03; 470.50)	146.75 (17.61; 275.90)
1.01 – 3.00	-4.49 (-96.54; 87.56)	-7.42 (-78.84; 63.99)	117.05 (-34.60; 268.71)	105.82 (-11.64; 223.29)
3.01 – 6.00	-35.00 (-137.47; 67.47)	-18.94 (-97.46; 59.58)	87.06 (-78.39; 252.51)	138.66 (10.92; 266.41)
6.01 – 12.00	71.58 (-37.06; 180.23)	-13.37 (-96.96; 70.22)	246.83 (62.03; 431.63)	169.99 (32.72; 307.27)
> 12.00	50.19 (-52.03; 152.40)	42.64 (-36.87; 122.15)	88.90 (-83.09; 260.88)	73.26 (-60.43; 206.94)
Pattern of breastfeeding at three months of age	<i>p</i> =0.042	<i>p</i> =0.304	<i>p</i> =0.205	<i>p</i> =0.824
Weaning	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Partial	49.28 (-7.64; 106.20)	29.91 (-13.25; 73.06)	-94.12 (-201.27; 13.03)	16.78 (-47.70; 81.26)
Exclusive/predominant	67.30 (11.06; 123.54)	26.83 (-17.05; 70.70)	-15.20 (-117.32; 86.92)	17.35 (-48.25; 82.95)

## Continuation

Variables	Women			
	1982 ( $\beta$ ; 95%CI)		1993 ( $\beta$ ; 95%CI)	
	Crude	Adjusted <sup>1</sup>	Crude	Adjusted <sup>2</sup>
Breastfeeding	<i>p</i> =0.262	<i>p</i> =0.289	<i>p</i> =0.111	<i>p</i> =0.366
No	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Yes	40.37 (-30.25; 110.99)	29.99 (-25.44; 85.42)	122.55 (-28.22; 273.32)	54.42 (-63.70; 172.55)
Total duration of breastfeeding (months)	<i>p</i> =0.676	<i>p</i> =0.199	<i>p</i> =0.282	<i>p</i> =0.679
Never	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
0.01 – 1.00	49.93 (-29.01; 128.87)	60.79 (-0.85; 122.43)	99.20 (-75.00; 273.40)	46.85 (-77.97; 171.67)
1.01 – 3.00	26.78 (-49.06; 102.62)	20.51 (-38.57; 79.59)	85.27 (-74.54; 245.08)	43.73 (-76.99; 164.45)
3.01 – 6.00	40.74 (-43.37; 124.85)	10.55 (-54.72; 75.81)	141.51 (-35.33; 318.34)	68.47 (-61.41; 198.35)
6.01 – 12.00	69.48 (-19.58; 158.54)	40.77 (-28.53; 110.07)	197.05 (19.54; 374.56)	29.52 (-102.17; 161.21)
> 12.00	33.57 (-49.89; 117.04)	15.68 (-49.29; 80.65)	132.74 (-33.70; 299.17)	74.82 (-49.44; 199.09)
Pattern of breastfeeding at three months of age	<i>p</i> =0.287	<i>p</i> =0.635	<i>p</i> =0.648	<i>p</i> =0.606
Weaning	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Partial	0.29 (-45.73; 46.30)	-16.60 (-51.55; 18.35)	21.22 (-65.79; 108.23)	13.87 (-36.38; 64.11)
Exclusive/predominant	33.84 (-11.11; 78.79)	-9.88 (-44.87; 25.11)	42.11 (-47.15; 131.37)	24.31 (-23.72; 72.34)

$\beta$ , regression coefficient. 95%CI, 95% confidence interval; *p*-value: *Wald's test for heterogeneity*

<sup>1</sup>Adjusted for maternal education, maternal age, family income, maternal smoking during pregnancy, gestational age, birth weight, z-score of height-for-age at 24 months, maternal skin color, parity and total physical activity, weight and height at 30 years; <sup>2</sup>Adjusted for maternal education, maternal age, family income, maternal smoking during pregnancy, gestational age, birth weight, z-score of height-for-age at 12 months, maternal skin color, parity and total physical activity, calcium intake, weight and height at 18 years

**Table 4** Crude and adjusted coefficients of the association between breastfeeding variables and whole body bone mineral density (BMD) at 18 and 30 years for men and women. The 1982 and 1993 Pelotas Birth Cohorts. Brazil.

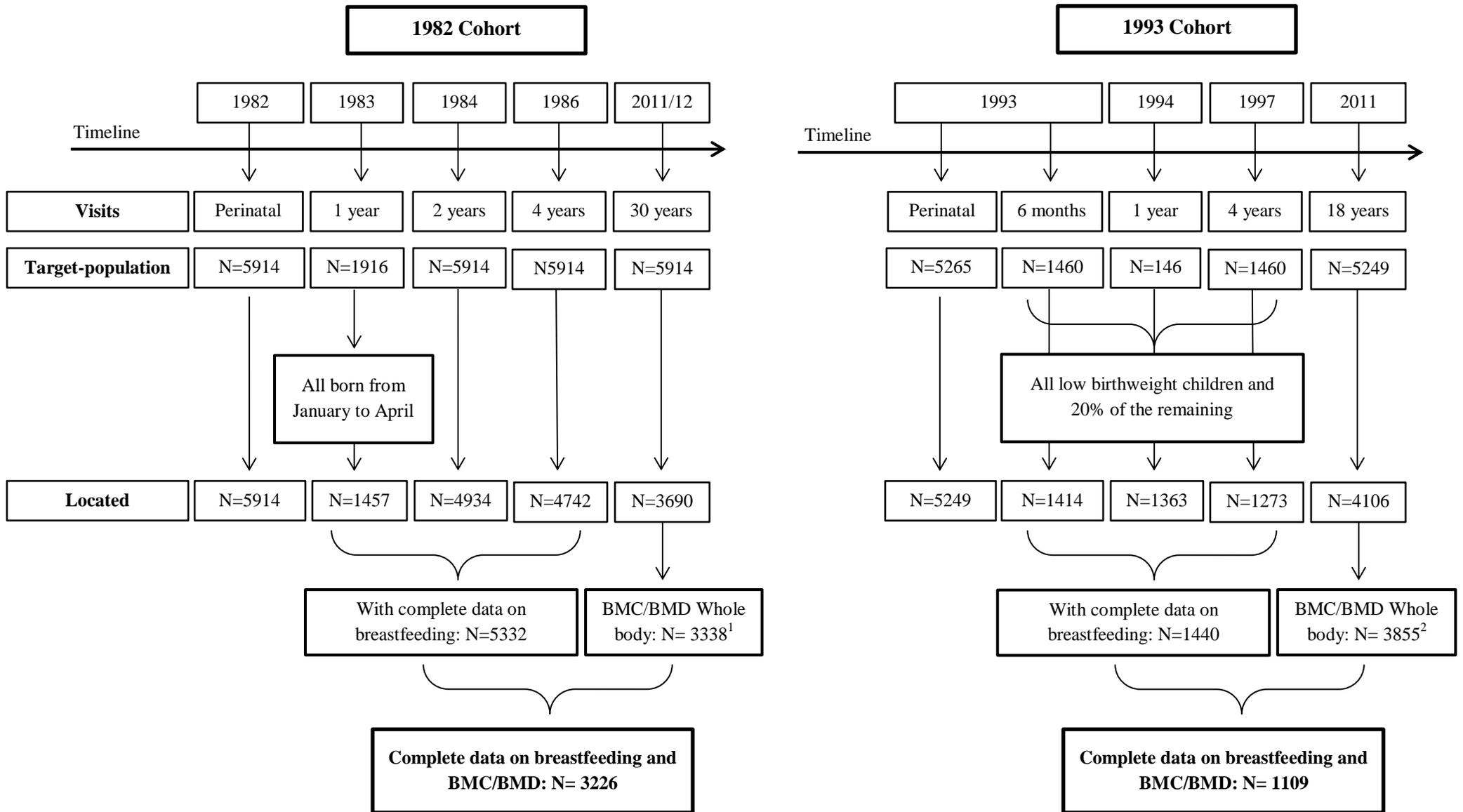
Variables	<i>Men</i>			
	1982 ( $\beta$ ; 95%CI)		1993 ( $\beta$ ; 95%CI)	
	Crude	Adjusted <sup>1</sup>	Crude	Adjusted <sup>2</sup>
Breastfeeding	<i>p</i> =0.703	<i>p</i> =0.734	<i>p</i> =0.042	<i>p</i> =0.043
No	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Yes	-0.003 (-0.021; 0.014)	-0.003 (-0.022; 0.015)	0.028 (0.001; 0.056)	0.026 (0.001; 0.050)
Total duration of breastfeeding (months)	<i>p</i> =0.007	<i>p</i> =0.205	<i>p</i> =0.009	<i>p</i> =0.116
Never	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
0.01 – 1.00	-0.016 (-0.036; 0.003)	-0.011 (-0.032; 0.009)	0.051 (0.016; 0.087)	0.030 (-0.001; 0.060)
1.01 – 3.00	-0.003 (-0.022; 0.016)	-0.003 (-0.023; 0.016)	0.019 (-0.010; 0.049)	0.018 (-0.008; 0.044)
3.01 – 6.00	-0.008 (-0.029; 0.013)	-0.007 (-0.029; 0.015)	0.019 (-0.013; 0.052)	0.028 (-0.001; 0.057)
6.01 – 12.00	0.013 (-0.010; 0.035)	-0.001 (-0.022; 0.024)	0.060 (0.023; 0.097)	0.044 (0.011; 0.076)
> 12.00	0.009 (-0.012; 0.030)	0.011 (-0.011; 0.033)	0.018 (-0.017; 0.053)	0.015 (-0.017; 0.047)
Pattern of breastfeeding at three months of age	<i>p</i> =0.023	<i>p</i> =0.253	<i>p</i> =0.676	<i>p</i> =0.479
Weaning	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Partial	0.013 (0.001; 0.025)	0.009 (-0.003; 0.021)	-0.005 (-0.027; 0.018)	0.001 (-0.013; 0.026)
Exclusive/predominant	0.014 (0.002; 0.025)	0.008 (-0.004; 0.020)	0.006 (-0.015; 0.027)	0.011 (-0.007; 0.030)

Continuation

Variables	Women			
	1982 ( $\beta$ ; 95%CI)		1993 ( $\beta$ ; 95%CI)	
	Crude	Adjusted <sup>1</sup>	Crude	Adjusted <sup>2</sup>
Breastfeeding	<i>p</i> =0.291	<i>p</i> =0.576	<i>p</i> =0.285	<i>p</i> =0.472
No	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Yes	0.008 (-0.007; 0.022)	0.004 (-0.010; 0.018)	0.027 (-0.023; 0.077)	0.016 (-0.027; 0.059)
Total duration of breastfeeding (months)	<i>p</i> =0.732	<i>p</i> =0.910	<i>p</i> =0.028	<i>p</i> =0.408
Never	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
0.01 – 1.00	0.005 (-0.011; 0.020)	0.006 (-0.010; 0.021)	0.014 (-0.039; 0.067)	0.010 (-0.035; 0.055)
1.01 – 3.00	0.007 (-0.008; 0.023)	0.004 (-0.011; 0.019)	0.021 (-0.030; 0.072)	0.012 (-0.032; 0.056)
3.01 – 6.00	0.006 (-0.010; 0.023)	-0.001 (-0.017; 0.016)	0.031 (-0.022; 0.084)	0.021 (-0.024; 0.066)
6.01 – 12.00	0.013 (-0.005; 0.031)	0.007 (-0.011; 0.024)	0.034 (-0.020; 0.088)	0.010 (-0.039; 0.056)
> 12.00	0.009 (-0.007; 0.026)	0.004 (-0.012; 0.021)	0.035 (-0.017; 0.087)	0.025 (-0.020; 0.070)
Pattern of breastfeeding at three months of age	<i>p</i> =0.446	<i>p</i> =0.946	<i>p</i> =0.105	<i>p</i> =0.268
Weaning	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Partial	0.004 (-0.005; 0.013)	-0.001 (-0.009; 0.008)	0.012 (-0.006; 0.029)	0.010 (-0.007; 0.024)
Exclusive/predominant	0.006 (-0.003; 0.015)	-0.002 (-0.010; 0.007)	0.019 (0.001; 0.037)	0.012 (-0.003; 0.026)

$\beta$ , regression coefficient. 95%CI, 95% confidence interval; *p*-value: *Wald's test for heterogeneity*

<sup>1</sup>Adjusted for maternal education, maternal age, family income, maternal smoking during pregnancy, gestational age, birth weight, z-score of height-for-age at 24 months, maternal skin color, parity and total physical activity, weight and height at 30 years; <sup>2</sup>Adjusted for maternal education, maternal age, family income, maternal smoking during pregnancy, gestational age, birth weight, z-score of height-for-age at 12 months, maternal skin color, parity and total physical activity, calcium intake, weight and height at 18 years



**Figure 1**

### **3. Artigo original 2**

---

Aceito para publicação pela revista *BMC Musculoskeletal Disorders*.

**Body mass index at 11 years and bone mass at age 18: path analysis within the  
1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study**

**Authors:**

Ludmila Correa Muniz<sup>1</sup> (LCM) [ludmuniz@yahoo.com.br](mailto:ludmuniz@yahoo.com.br)

Ana Maria Baptista Menezes<sup>1</sup> (AMBM) [anamene@terra.com.br](mailto:anamene@terra.com.br)

Maria Cecília Formoso Assunção<sup>1</sup> (MCFA) [cecilia.epi@gmail.com](mailto:cecilia.epi@gmail.com)

Jeovany Martínez-Mesa<sup>1</sup> (JMM) [jeovanymm@yahoo.es](mailto:jeovanymm@yahoo.es)

Fernando Cesar Wehrmeister<sup>1</sup> (FCW) [fcwehrmeister@yahoo.com.br](mailto:fcwehrmeister@yahoo.com.br)

Laura D Howe<sup>2</sup> (LDH) [laura.howe@bristol.ac.uk](mailto:laura.howe@bristol.ac.uk)

Pedro Curi Hallal<sup>1</sup> (PCH) [prchallal@gmail.com](mailto:prchallal@gmail.com)

Helen Gonçalves da Silva<sup>1</sup> (HGS) [hdgs.epi@gmail.com](mailto:hdgs.epi@gmail.com)

Fernando C. Barros<sup>1</sup> (FCB) [fcbarros.epi@gmail.com](mailto:fcbarros.epi@gmail.com)

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Epidemiology. Federal University of Pelotas. Brazil.

<sup>2</sup> MRC Integrative Epidemiology Unit at the University of Bristol, School of Social and Community Medicine, University of Bristol, Bristol, UK.

**Corresponding author:**

Ludmila Correa Muniz

e-mail: [ludmuniz@yahoo.com.br](mailto:ludmuniz@yahoo.com.br)

Post-Graduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas.

Street: Marechal Deodoro 1160 (3º andar). CEP: 96020-220. Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. Phone: +55 (53) 3284-1302 Fax: +55 (53) 3284-1300

## **Abstract**

**Background:** We investigated whether Body Mass Index (BMI) at 11 years old has a direct effect on bone mass at age 18 operating through alterations to bone growth and development, or whether the association is mediated by concurrent BMI, fat mass (FM), and fat free mass (FFM).

**Methods:** Path analysis was used to explore the association between BMI at age 11 and whole-body bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD) assessed by dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) at age 18 in a prospective birth cohort study comprising 3,307 adolescents; we also evaluated the degree to which this association was mediated by BMI, FM (kg) and FFM (kg) assessed by plethysmography (BOD POD) at age 18.

**Results:** We found a positive association between BMI at age 11 and BMC (males [ $\beta = 179.7\text{g}$ , 95%CI 161.4; 198.0]; females [ $\beta = 179.9\text{g}$ , 95% CI 165.3; 194.6]) and BMD (males [ $\beta = 0.030\text{g/cm}^2$ , 95%CI 0.024; 0.035]; females [ $\beta = 0.029\text{g/cm}^2$ , 95% CI 0.025; 0.033]) at age 18. This association was largely mediated by BMI and FFM at age 18 in both female and male adolescents. FM at age 18 was not an important mediator.

**Conclusions:** Concurrent BMI and FFM were the main mediators of the association between BMC/BMD in late adolescence and BMI in early adolescence.

**Keywords:** Bone mass; body composition; DXA; cohort studies; adolescence.

## **Background**

The development of the human skeletal system and bone health are affected by genetic, sociodemographic, hormonal, environmental, and nutritional factors, as well as the interactions among them[1]. Of the measures of nutritional status, body weight has been identified as a major determinant of fracture risk, given its direct association with bone content and bone mineral density (BMD) [2]. Many studies have shown that both high body weight and high body mass index (BMI) are associated with higher bone mass and that weight loss may lead to bone loss [3,4].

It is therefore possible that BMI during childhood and adolescence might influence later BMC/BMD. The existing evidence on this topic is inconsistent. For example, Tandon et al. report positive correlations between BMI from age 4 onwards with both BMC and BMD assessed during adulthood [5], whereas some studies finding excess weight to be associated with lower bone mass [6-8] and others not finding any association between BMI and BMD [9].

The mechanisms underlying a possible association are not clear. One possibility is that BMI during childhood/adolescence, when growth is rapid, leads to immediate changes in the mechanisms underlying bone growth, and these mechanistic changes persist across the life course. Alternatively, concurrent body size may be the most important determinant of BMC/BMD, and any association between BMI in childhood and later BMC/BMD could be due to ‘tracking’ of body size and composition. Prospective studies are needed to disentangle these two potential mechanisms.

Regarding body weight components, El Hage et al. reported that FM was the key determinant of BMD in girls while FFM was the key determinant of BMD in boys pointing to an apparently gender-dependent relationship during adolescence [10]. In this study, we assessed the association between BMI at age 11 and BMC and BMD at age 18 in a large prospective cohort from Pelotas, Brazil. We further examined the potential roles of BMI, FM and FFM at age 18 in explaining these associations. Considering that body composition changes between sexes the analysis of the present paper was stratified by sex.

## **Methods**

All live births in 1993 (N = 5,265) living in the urban area of Pelotas, a southern city in Brazil, were eligible to participate in a cohort study. The cohort sample comprised 5,249 live births (16 refused to participate). We followed subsets of this original cohort at the age of one, three, and six months and one, four, six, and nine years. In 2004–2005, 2008–2009, and 2011–2012, when cohort participants were 11, 15 and 18 years of age, respectively, all participants of the original cohort were invited to follow-up assessments. The analyses of the present study were based on data collected in the follow-ups of the 11 and 18 years old. The full methods of the 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study are published elsewhere [11-13].

The outcomes were whole-body BMC (g) and BMD ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ). Both measures were obtained when participants were aged 18 years by dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) (Lunar Prodigy Advance – GE<sup>®</sup>, Germany) [14]. DXA scans were not performed in participants who were pregnant/suspected pregnant, wheelchair users and/or individuals with osteoarticular deformities, those who had implanted metal pins, screws, plates and non-removable metallic objects (body piercings and/or chains), extremely obese individuals, or those with height over 1.92 m.

The main exposure of interest was BMI-for-age (z-score) at age 11 years, defined according to the World Health Organization (WHO) reference charts for children and adolescents 5–19 years [15]. BMI (z-score), FM (kg) and FFM (kg) at age 18 were evaluated as potential mediators of the association between BMI at age 11 and BMC/BMD at age 18. FM and FFM were obtained by air-displacement plethysmography (BOD POD<sup>®</sup>), since it is considered the gold standard for measuring FM and FFM [16-18]. All variables were analyzed as continuous values.

Analyses were performed using Stata 12.0 (Stata Corp., College Station, Texas, and EUA) and stratified by sex given evidence of a gender difference in bone mass acquisition [1,19]. We used path analysis (a form of structural equation modelling that facilitates analysis of mediation) to investigate whether the association between BMI at age 11 and BMC/BMD at age 18 is mediated by body composition at age 18, or whether there is a direct effect of BMI at age 11 (i.e. an effect that operates through pathways other than through BMI, FM or FFM at age 18). Figure 1 shows hypothesized relationships between the study variables.

We evaluated the mediating roles of BMI, FM and FFM at 18 years, i.e. contemporaneous to the outcomes separately, and the combined role of these potential mediators. For each model, we calculated the total effect (the overall association between BMI at 11 and BMC/BMD at age 18 after adjustment for confounders), the direct effect (the association between BMI at age 11 and BMC/BMD at age 18 after taking account of both confounders and mediators) and the percentage of the association between BMI at age 11 and BMC/BMD at age 18 that is explained by each mediator (or set of mediators).

At age 11 the following confounders were taken into account: interviewer-reported skin color (white, non-white); family income (in Brazilian Real [RS]); maternal education (0–4, 5–8, 9–11, 12 or more years of schooling); leisure-time and commuting physical activity (minutes/week) and adolescent smoking status (smoked at least one cigarette in the last 30 days: yes / no); and at age of 18 years (BMI z-score, FM and FFM) all of the aforementioned potential confounders were included in addition to: leisure-time and commuting physical activity (minutes/week); smoking status (smoked at least one cigarette in the last 30 days: yes / no); calcium intake (mg/day adjusted for total calories) collected using a semiquantitative food frequency questionnaire; and height (m) and height squared ( $m^2$ ) at age 18. We adjusted for height and height squared because the assessment of the model's quality criteria showed better fit with the inclusion of these two variables.

The present study was approved by the Research Ethics Committee of Universidade Federal de Pelotas School of Medicine. All participants signed a free informed consent form prior to data collection.

## **Results**

At 18 years 4,106 adolescents (81.3% of the original cohort) were evaluated, of which 2,015 (49.1%) were males. Whole-body BMC and BMD were available for 3,855 participants. Of these, 1,601 males and 1,706 females had complete data on exposure, mediators and confounders, and were therefore included in the analyses. Table 1 shows a comparison between participants included and those not included in the analyses (1,230 losses of follow-up / excluded + 164 deaths + 548 with missing data). Non-white participants and smokers had slightly lower follow up rates than their counterparts did.

We also observed lower mean BMI z-score, FM and FFM at age 18 among the male participants as compared to those lost to follow up. Higher family income and a lower proportion of low maternal education ( $\leq 8$  years) were also observed among females included in the analysis as compared to those lost to follow up.

Higher BMI at age 11 was associated with higher BMI, FM and FFM at age 18 in both sexes (see Additional files 1 to 12). At age 18, BMI and FFM were positively associated with BMC and BMD in males and females. FM was positively associated with BMD in females (see Additional file 11) and with BMC in both sexes, and it was inversely associated with BMD in males (see Additional file 5). For example, an increase of 1 kg in FM at age 18 was associated with a BMD  $0.002 \text{ g/cm}^2$  lower among males (95% CI -0.002; -0.001,  $p < 0.001$ ).

Tables 2 and 3 show the overall association between BMI at age 11 and bone mass at age 18 in males and females, respectively, and also, the association after accounting by mediation. BMI at age 11 was associated with greater BMC at age 18 in males by 179.7 g (95%CI 161.4; 198.0,  $p < 0.001$ ) and in females by 179.9 g (95%CI 165.3; 194.6,  $p < 0.001$ ). A positive association was also observed between BMI at age 11 and BMD at age 18 in both sexes (males [ $\beta = 0.030 \text{ g/cm}^2$ , 95%CI 0.024; 0.035,  $p < 0.001$ ]; females [ $\beta = 0.029 \text{ g/cm}^2$ , 95% CI 0.025; 0.033,  $p < 0.001$ ]).

BMI and FFM at age 18 were found to be strong mediators of the association between BMI at age 11 and bone mass; in almost all cases, the positive association between BMI at age 11 and BMC/BMD was reduced after taking these pathways into account (Tables 2 and 3). In males, both BMI and FFM at age 18 years were key mediators. For example, after the inclusion of these two variables in the model, 85.7% and 78.4%, respectively, of the total effect of BMI at age 11 on BMC, was mediated by the model (Table 2). Among men, 83.3% of the association between BMI at age 11 and BMD was mediated by BMI and 90.0% by FFM. In females (Table 3), the mediation was less marked; BMI at age 18 acted as the key mediator in the association between BMI at age 11 and BMC (68.6% of the total effect) and FFM was the key mediator in the association with BMD (89.7%).

FM was not found to be a strong mediator of the association between BMI at age 11 and BMC/BMD at age 18. In females, the percentage mediation was much lower than for

BMI or FFM; 31.9% for BMC and 13.8% for BMD. In males, the percent mediation was 6.9% for the association between BMI at age 11 and BMC at age 18. FM had a negative association with BMD in males (see Additional file 5), and as such did not mediate the association between BMI at age 11 and BMD at age 18.

## **Discussion**

Our findings point to a positive association between BMI at age 11 and both BMC and BMD at age 18, with this association being largely mediated by contemporaneous body composition at age 18, in particular by BMI and FFM. Recent scientific evidence has shown that greater body weight or BMI correlate positively with BMD and BMC [2,5]. In this study, we have demonstrated a positive association between BMI at two different time points in adolescence and BMC/BMD at age 18. One potential explanation for this finding is that higher BMI may lead to an increased osteogenesis resulting from the mechanical load exerted by excessive weight on bone structure [20].

We found a positive association of FFM with BMC/BMD in both sexes, which corroborates the findings of other studies [21-23] and of a recent meta-analysis [24]. Several hypotheses have been postulated to explain the positive association between FFM and bone mass. The most robust hypothesis is that muscles and other fat-free soft tissues exert mechanical loads on bone tissue [25]. Additional muscle and FFM due to either greater physical activity or greater total body mass can promote increased bone mass [26-28].

We also found a negative association of FM with BMD in males, corroborating the findings of a recent meta-analysis [24] and of other studies with adults and adolescents [10,29,30]. However, it is noteworthy that a positive association with BMC/BMD was observed in females in our analyses. Some studies have reported higher FM associated with increased bone mass among females [10]. Several mechanisms could explain the relationship between FM and bone mass: e.g. mechanical load on bone tissue exerted by fatty soft tissues, or the association of FM with hormones secreted from pancreatic beta cells (insulin and amylin) and adipocytes (estrogens and leptin) that have a direct or indirect effect on osteogenesis [25,31-33]. It should also be stressed that during adolescence girls gain more FM while boys gain more lean

mass [34]. The difference in body composition of males and females may possibly explain this positive association of FM with BMC observed only among females.

All variables studied here (BMI, FM and FFM at age 18) acted to some extent as mediators of the association of BMI in early adolescence with BMC and BMD at age 18. There were major differences between males and females. Among men, it was observed that the association between BMI at 11 years and BMD was completely mediated by BMI, FM and FFM at 18 years; the inclusion of these mediators strongly attenuated the association towards the null hypothesis; the same was not observed for BMC. This suggests that, at least in males, BMI in early adolescence is not a major determinant of bone mineral density later in life, other than through ‘tracking’, i.e. individuals with high BMI at age 11 tend to remain at high BMI across the life course.

In females, BMI, FM and FFM at age 18 partially explained the association between BMI in early adolescence and BMC/BMD, but there remained an association between BMI at age 11 and BMC/BMD even after controlling for the mediators. Therefore, in contrast to the findings in males, BMI in early adolescence may be a determinant of bone mass at age 18 in females independent of concurrent body size and composition. These differences of males and females may be attributed to the effect of hormones on body composition and bone mass acquisition. However, the 1993 Pelotas birth cohort did not provide accurate sexual maturation data including sex hormone levels, and so this hypothesis cannot be further evaluated within this population. Boys and girls do not show the same timing of changes in body composition and bone development resulting from sexual maturation [34]. Girls typically start puberty two years earlier than boys [34], and by age 11 have entered puberty while boys still are prepubertal [34]. A possible explanation to our finding is that BMI at age 11 is a marker for pubertal status in females but not males, and that age of puberty onset influences BMC and BMD.

To the best of our knowledge, this is the first study conducted with data from a prospective birth cohort that sought to examine the association between BMI at different time points in adolescence, FM, FFM and bone mass in late adolescence, using path analysis. Path analysis is an extension of multiple regression that facilitates modeling the relationships among all variables simultaneously, facilitating the analysis of pathways and mediation [35]. Another strength of the present study was that BMC

and BMD measures were obtained by DXA, which is the gold-standard method for measuring bone mass [36]. Despite its innovative approach, the study has a number of limitations. First, as with all longitudinal studies, we had follow up losses of participants. However, we believe these losses did not affect our results, because there were no significant differences for most variables between participants included and those not included in the analysis, and we have no reason to expect that the association between BMI at age 11 and BMC/BMD at age 18 would differ between those included and those excluded from our analyses. Second, there was no information about vitamin D status, which plays a major role in the intestinal absorption of calcium, and as such we are unable to explore this. The lack of information on vitamin D and on sexual maturation are the most important limitations of the present paper for understanding the association between BMC at the beginning of adolescence and BMC/BMD at 18 years old. The next follow-ups of this cohort will add important contributions on this issue.

## **Conclusions**

This study found a positive association of BMI at age 11 with BMC and BMD at age 18. This association was partially mediated by BMI and FFM at age 18, particularly in males. FM was not an important mediator of the association between BMI at 11 and BMC/BMD at 18 years. Our findings suggest that concurrent BMI and FFM are the main mediators of the association between BMC and BMD in late adolescence and BMI in earlier adolescence.

## **List of abbreviations**

BMI: body mass index; FM: fat mass; FFM: fat free mass; BMC: bone mineral content; BMD: bone mineral density; DXA: Dual-energy x-ray absorptiometry.

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

## **Authors' contributions**

Design: all authors; Data collection LCM, JMM, FCW; Statistical analyses: LCM, JMM, LDH; First draft of manuscript: LCM. Revisions of different versions of the manuscript: all authors. All authors read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgements**

This article is based on data from the study "Pelotas Birth Cohort, 1993" conducted by Postgraduate Program in Epidemiology at Universidade Federal de Pelotas with the collaboration of the Brazilian Public Health Association (ABRASCO). From 2004 to 2013, the Wellcome Trust supported the 1993 birth cohort study. The European Union, National Support Program for Centers of Excellence (PRONEX), the Brazilian National Research Council (CNPq), and the Brazilian Ministry of Health supported previous phases of the study. L.H. is funded by a UK Medical Research Council fellowship ( G1002375 ) and works in a unit that receives core funding from the UK Medical Research Council and the University of Bristol ( MC\_UU\_12013/9 ).

### **References**

1. Cooper C, Westlake S, Harvey N, Javaid K, Dennison E, Hanson M: **Review: developmental origins of osteoporotic fracture.** *Osteoporos Int* 2006, **17**(3):337-347.
2. Beck TJ, Oreskovic TL, Stone KL, Ruff CB, Ensrud K, Nevitt MC, Genant HK, Cummings SR: **Structural adaptation to changing skeletal load in the progression toward hip fragility: the study of osteoporotic fractures.** *J Bone Miner Res* 2001, **16**(6):1108-19.
3. Guney E, Kisakol G, Ozgen G, Yilmaz C, Yilmaz R, Kabalak T: **Effect of weight loss on bone metabolism: comparison of vertical banded gastroplasty and medical intervention.** *Obes Surg* 2003, **13**:383-388.
4. Radak TL: **Caloric restriction and calcium's effect on bone metabolism and body composition in overweight and obese premenopausal women.** *Nutr Rev* 2004, **62**:468-481.
5. Tandon N, Fall CHD, Osmond C, Sachdev HPS, Prabhakaran D, Ramakrishnan L, Dey Biswas SK, Ramji S, Khalil A, Gera T, Reddy KS, Barker DJP, Cooper C,

Bhargava SK: **Growth from birth to adulthood and peak bone mass and density data from the New Delhi Birth Cohort.** *Osteoporos Int* 2012, **23**(10):2447-2459.

6. Goulding A, Taylor RW, Jones IE, McAuley KA, Manning PJ, Williams SM: **Overweight and obese children have low bone mass and area for their weight.** *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000, **24**:627–632.

7. Goulding A, Taylor RW, Jones IE, Manning PJ, Williams SM: **Spinal overload: a concern for obese children and adolescents?** *Osteoporos Int* 2002, **13**:835–840.

8. Rocher E, Chappard C, Jaffre´ C, Benhamou CL, Courteix D: **Bone mineral density in prepubertal obese and control children: relation to body weight, lean mass, and fat mass.** *J Bone Miner Metab* 2008, **26**:73–78.

9. El Hage R, Jacob C, Moussa E, Benhamou CL, Jaffré C: **Total body, lumbar spine and hip bone mineral density in overweight adolescent girls: decreased or increased?** *J Bone Miner Metab* 2009, **27**:629-633.

10. El Hage RP, Courteix D, Benhamou CL, Jacob C, Jaffré C: **Relative importance of lean and fat mass on bone mineral density in a group of adolescent girls and boys.** *Eur J Appl Physiol* 2009, **105**:759-764.

11. Araujo CL, Menezes AM, Vieira MF, Neutzling MB, Goncalves H, Anselmi L, Dumith SC, Hallal PC: **The 11-year follow-up of the 1993 Pelotas (Brazil) birth cohort study: methods.** *Cad Saude Publica* 2010, **26**:1875-1886.

12. Victora CG, Hallal PC, Araujo CL, Menezes AM, Wells JC, Barros FC: **Cohort profile: the 1993 Pelotas (Brazil) birth cohort study.** *Int J Epidemiol* 2008, **37**:704-709.

13. Gonçalves H, Assunção MCF, Wehrmeister FC, Oliveira IO, Barros FC, Victora CG, Hallal PC, Menezes AMB: **Cohort profile updated: The 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort follow-up visits in adolescence.** *Int J Epidemiol* 2014, doi: 10.1093/ije/dyu077.

14. Kelly TL, Wilson KE, Heymsfield SB: **Dual energy X-Ray absorptiometry body composition reference values from NHANES.** *PLoS One* 2009, **4**:e7038.

15. De Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J: **Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents.** *Bull World Health Organ* 2007, **85**:660-667.
16. Fields DA, Goran MI, McCrory MA: **Body-composition assessment via air-displacement plethysmography in adults and children: a review.** *Am J Clin Nutr* 2002, **75**:453-67.
17. Ellis KJ: **Human body composition: in vivo methods.** *Physiological reviews* 2000, **80**(2):649-80.
18. Heymsfield S. Human body composition, Human Kinetics Publishers. 2005.
19. Hasselstrom H, Karlsson KM, Hansen SE, Gronfeldt V, Froberg K, Andersen LB: **Sex differences in bone size and bone mineral density exist before puberty. The Copenhagen School Child Intervention Study (CoSCIS).** *Calcif Tissue Int* 2006, **79**(1):7-14.
20. Beck TJ, Oreskovic TL, Stone KL, Ruff CB, Ensrud K, Nevitt MC, Genant HK, Cummings SR: **Structural adaptation to changing skeletal load in the progression toward hip fragility: the study of osteoporotic fractures.** *J Bone Miner Res* 2001, **16**(6):1108-19.
21. Ho-Pham LT, Nguyen ND, Nguyen TV: **Contributions of lean mass and fat mass to bone mineral density: a study in postmenopausal women.** *BMC Musculoskelet Disord* 2010, **11**:59.
22. Liu-Ambrose T, Kravetsky L, Bailey D, Sherar L, Mundt C, Baxter-Jones A, Khan KM, McKay HA: **Change in lean body mass is a major determinant of change in areal bone mineral density of the proximal femur: a 12-year observational study.** *Calcified tissue international* 2006, **79**(3):145-51.
23. Marin RV, Pedrosa MA, Moreira-Pfrimer LD, Matsudo SM, Lazaretti-Castro M: **Association between lean mass and handgrip strength with bone mineral density in physically active postmenopausal women.** *J Clin Densitom* 2010, **13**(1):96-101.

24. Ho-Pham LT, Nguyen UDT, Nguyen TV: **Association between lean mass, fat mass, and bone mineral density: a meta-analysis.** *J Clin Endocrinol Metab* 2014, **99**(1):30-38.
25. Reid IR: **Relationships among body mass, its components, and bone.** *Bone* 2002, **31**(5):547-555:
26. Harvey NC, Cole ZA, Crozier SR, Kim M, Ntani G, Goodfellow L, Robinson SM, Inskip HM, Godfrey KM, Dennison EM, Wareham N, Ekelund U, Cooper C; SWS Study Group: **Physical activity, calcium intake and childhood bone mineral: a population-based cross-sectional study.** *Osteoporos Int* 2011, **23**(1):121-30.
27. Bielemann RM, Domingues MR, Horta BL, Menezes AMB, Gonçalves H, Assunção MCF, Hallal PC: **Physical activity throughout adolescence and bone mineral density in early adulthood: the 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study.** *Osteoporos Int* 2014, **25**(8):2007-15.
28. Bielemann RM, Domingues MR, Horta BL, Gigante DP: **Physical activity from adolescence to young adulthood and bone mineral density in young adults from the 1982 Pelotas (Brazil) Birth Cohort.** *Prev Med* 2014, **62**:201-207.
29. El Hage R, Jacob C, Moussa E, Baddoura R: **Relative importance of lean mass and fat mass on bone mineral density in a group of Lebanese postmenopausal women.** *J Clin Densitom* 2011, **14**(3):326-31.
30. Andreoli A, Bazzocchi A, Celi M, Lauro D, Sorge R, Tarantino U, Guglielmi G: **Relationship between body composition, body mass index and bone mineral density in a large population of normal, osteopenic and osteoporotic women.** *Radiol Med* 2011, **116**(7):1115-23.
31. Cornish J, Callon KE, Reid IR: **Insulin increases histomorphometric indices of bone formation in vivo.** *Calcif Tissue Int* 1996, **59**:492-495.
32. Hickman J, McElduff A: **Insulin promotes growth of the cultured rat osteosarcoma cell line UMR-106-01: An osteoblast-like cell.** *Endocrinology* 1989, **124**:701-706.

33. Reid IR, Ames R, Evans MC, Sharpe S, Gamble G, France JT, Lim TMT, Cundy TF: **Determinants of total body and regional bone mineral density in normal postmenopausal women: A key role for fat mass.** *J Clin Endocrinol Metab* 1992, **75**:45-51.
34. Wells JC: **Sexual dimorphism of body composition.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007, **21**(3):415-430.
35. Gamborg M, Andersen PK, Baker JL, Budtz-Jorgensen E, Jorgensen T, Jensen G, Sorensen TIA: **Life course path analysis of birth weight, childhood growth, and adult systolic blood pressure.** *Am J Epidemiol* 2009, **169**(10):1167-1178.
36. Lewiecki EM, Watts NB, McClung MR, Petak SM, Bachrach LK, Shepherd JA et al: **Official positions of the international society for clinical densitometry.** *J Clin Endocrinol Metab* 2004, **89**(8):3651-3655.

### **Figure legends**

Figure 1\_**Short title:** Analytical Model. **Detailed legend:** Analytical model to evaluate the association between body mass index (BMI) z score at 11 years and total body bone mineral content (BMC) and body mineral density (BMD) at 18 years old, and the mediation by BMI z score, fat mass (FM) and fat free mass (FFM) at 18 years. **Endnotes:** 1. Adjusted for skin color, maternal schooling, family income, physical activity and smoking at 11 years; 2. Adjusted for 1 + physical activity, smoking, calcium intake, height and height squared at 18 years. Solid lines: direct effect of BMI z score at 11 years old on BMI z score, fat mass and fat free mass at 18 years and on BMC/BMD at 18 years. Dashed lines: indirect effect of BMI z score at 11 years on BMC/BMD after mediation through BMI z score, fat mass and fat free mass at 18 years (calculated as the product of these two arrows). Dotted lines: direct effect of BMI z score, fat mass and fat free mass at 18 years on BMC/BMD at 18 years old.

### **Additional files**

Additional figures that will help for a better understanding of the manuscript.

Additional file 1\_ **Figure 2**: Overall association between BMI z score at 11 and 18 years and bone mineral content at age18 among males (N=1601). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

Additional file 2\_ **Figure 3**: Overall association between BMI z score at 11, fat mass and bone mineral content at age18 among males (N=1601). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

Additional file 3\_ **Figure 4**: Overall association between BMI z score at 11, fat free mass and bone mineral content at age18 among males (N=1601). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

Additional file 4\_ **Figure 5**: Overall association between BMI z score at 11 and 18 years and bone mineral density at age18 among males (N=1601). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

Additional file 5\_ **Figure 6**: Overall association between BMI z score at 11, fat mass and bone mineral density at age18 among males (N=1601). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

Additional file 6\_ **Figure 7**: Overall association between BMI z score at 11, fat free mass and bone mineral density at age18 among males (N=1601). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

Additional file 7\_ **Figure 8**: Overall association between BMI z score at 11 and 18 years and bone mineral content at age18 among females (N=1601). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

Additional file 8\_ **Figure 9**: Overall association between BMI z score at 11, fat mass and bone mineral content at age18 among females (N=1601). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

Additional file 9\_ **Figure 10**: Overall association between BMI z score at 11, fat free mass and bone mineral content at age18 among females (N=1601). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

Additional file 10\_ **Figure 11**: Overall association between BMI z score at 11 and 18 years and bone mineral density at age18 among females (N=1601). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

Additional file 11\_ **Figure 12**: Overall association between BMI z score at 11, fat mass and bone mineral density at age18 among females (N=1601). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

Additional file 12\_ **Figure 13**: Overall association between BMI z score at 11, fat free mass and bone mineral density at age18 among females (N=1601). The 1993 Pelotas Birth Cohort Brazil.

**Table 1** Characteristics of participants with complete data compared with participants with missing data or losses of follow-up, stratified by gender. The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

Variables	Males			Females		
	N		p-value	N		p-value
	Participants included in the analysis	Participants excluded from the analysis <sup>a</sup>		Participants included in the analysis	Participants excluded from the analysis <sup>a</sup>	
<b>Follow-up at 11 years</b>						
Family income	N=1601 1219.77 (2966.82)	N=590 1054.02 (2403.48)	0.224 <sup>b</sup>	N=1706 1062.79 (1597.87)	N=555 849.28 (1565.43)	0.006 <sup>b</sup>
Maternal education (years)	N=1601	N=572	0.099 <sup>c</sup>	N=1706	N=535	<0.001 <sup>c</sup>
0-4	24.9%	29.6%		22.6%	35.9%	
5-8	42.5%	42.1%		43.5%	44.1%	
9-11	22.4%	20.1%		23.5%	13.6%	
≥12	10.2%	8.2%	10.4%	6.4%		
Skin color	N=1601	N=509	0.040 <sup>c</sup>	N=1706	N=507	0.013 <sup>c</sup>
White	65.5%	60.5%		65.2%	59.2%	
Non-white	34.5%	39.5%		34.8%	40.8%	
Total physical activity (minutes/week)	N=1601 514.80 (523.77)	N=515 559.49 (563.32)	0.098 <sup>b</sup>	N=1706 347.41 (405.32)	N=465 325.42 (367.51)	0.29 <sup>b</sup>
Smoking	N=1601	N=484	0.129 <sup>c</sup>	N=1706	N=487	0.061 <sup>c</sup>
No	97.6%	96.3%		98.1%	96.7%	
Yes	2.4%	3.7%		1.9%	3.3%	
BMI z score <sup>d</sup>	N=1601 0.46 (1.22)	N=583 0.52 (1.35)	0.349 <sup>b</sup>	N=1706 0.27 (1.23)	N=551 0.31 (1.20)	0.531 <sup>b</sup>

Continuation

Variables	Males			Females		
	N		p-value	N		p-value
	Participants included in the analysis	Participants excluded from the analysis <sup>a</sup>		Participants included in the analysis	Participants excluded from the analysis <sup>a</sup>	
<b>Follow-up at 18 years</b>						
Total physical activity (minutes/week)	N=1601 855.53 (914.26)	N=407 910.45 (913.21)	0.279 <sup>b</sup>	N=1706 455.94 (583.28)	N=381 460.20 (521.76)	0.895 <sup>b</sup>
Smoking	N=1601	N=414	0.001 <sup>c</sup>	N=1706	N=385	<0.001 <sup>c</sup>
No	86.2%	79.5%		88.5%	81.0%	
Yes	13.8%	20.5%	11.5%	19.0%		
BMI z score <sup>d</sup>	N=1601 0.25 (1.15)	N=372 0.45 (1.39)	0.005 <sup>b</sup>	N=1706 0.44 (1.18)	N=295 0.47 (1.30)	0.753 <sup>b</sup>
Fat mass (kg)	N=1601 12.46 (8.72)	N=369 14.40 (12.60)	<0.001 <sup>b</sup>	N=1706 20.75 (8.90)	N=297 21.19 (11.60)	0.453 <sup>b</sup>
Fat free mass (kg)	N=1601 57.74 (7.04)	N=369 58.67 (8.25)	0.026 <sup>b</sup>	N=1706 40.15 (4.99)	N=297 40.67 (5.41)	0.101 <sup>b</sup>
Height (m)	N=1601 1.74 (0.07)	N=369 1.74 (0.08)	0.857 <sup>b</sup>	N=1706 1.61 (0.06)	N=298 1.61 (0.06)	0.874 <sup>b</sup>
Calcium intake (mg/day)	N=1601 709.16 (332.71)	N=336 726.61 (340.34)	0.384 <sup>b</sup>	N=1706 694.27 (351.62)	N=316 679.39 (364.83)	0.492 <sup>b</sup>
Bone mineral content (g)	N=1601 2963.12 (465.24)	N=302 2927.32 (441.61)	0.216 <sup>b</sup>	N=1706 2410.69 (396.08)	N=246 2411.90 (386.86)	0.964 <sup>b</sup>
Bone mineral density (g/cm <sup>2</sup> )	N=1601 1.22 (0.10)	N=302 1.22 (0.09)	0.544 <sup>b</sup>	N=1706 1.13 (0.08)	N=246 1.13 (0.08)	0.902 <sup>b</sup>

N - Number of observations; SD - Standard deviation; BMI - body mass index; <sup>a</sup> Participants excluded from analysis due to losses of follow-up or missing data;

<sup>b</sup> t-test; <sup>c</sup> Chi-square test; <sup>d</sup> According to the World Health Organization for children and teenagers from 5 to 19 years

**Table 2** Association between body mass index (BMI) z score at 11 years old and bone mass at 18 years mediated by BMI z score, fat mass and fat free mass at 18 years. The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil. N= 1601 males.

Association entre BMI z score at 11 y and BMC/BMD	BMC (g)		BMD (g/cm <sup>2</sup> )	
	$\beta$ (95%CI) p-value		$\beta$ (95%CI) p-value	
	Association	% mediation	Association	% mediation
Overall association <sup>(A)</sup>	179.714 (161.401; 198.027) <i>p</i> <0.001	n/a	0.030 (0.024; 0.035) <i>p</i> <0.001	n/a
Association after accounting for mediation by BMI z score at 18 years old <sup>(B)</sup>	25.764 (8.536; 42.993) <i>p</i> =0.003	85.7	0.005 (-0.0004; 0.010) <i>p</i> =0.068	83.3
Association after accounting for mediation by fat mass at 18 years old <sup>(B)</sup>	167.344 (151.041; 183.648) <i>p</i> <0.001	6.9	0.037 (0.032; 0.041) <i>p</i> <0.001	- <sup>a</sup>
Association after accounting for mediation by fat free mass at 18 years old <sup>(B)</sup>	38.820 (27.874; 49.766) <i>p</i> <0.001	78.4	-0.003 (-0.007; -0.0001) <i>p</i> =0.044	90.0
Association after accounting for mediation by BMI z score, fat mass and fat free mass at 18 years old <sup>(B)</sup>	20.375 (6.717; 34.033) <i>p</i> =0.003	88.7	0.003 (-0.001; 0.007) <i>p</i> =0.160	90.0

$\beta$  - Linear regression coefficient; 95%CI - 95% confidence interval; p-value from Wald's test; BMC - bone mineral content; BMD - bone mineral density; BMI - body mass index; BMI z score: according to the World Health Organization for children and teenagers from 5 to 19 years

% mediation = 100 - (Direct effect / Total effect)\*100, ie, 100 - (B / A)\*100

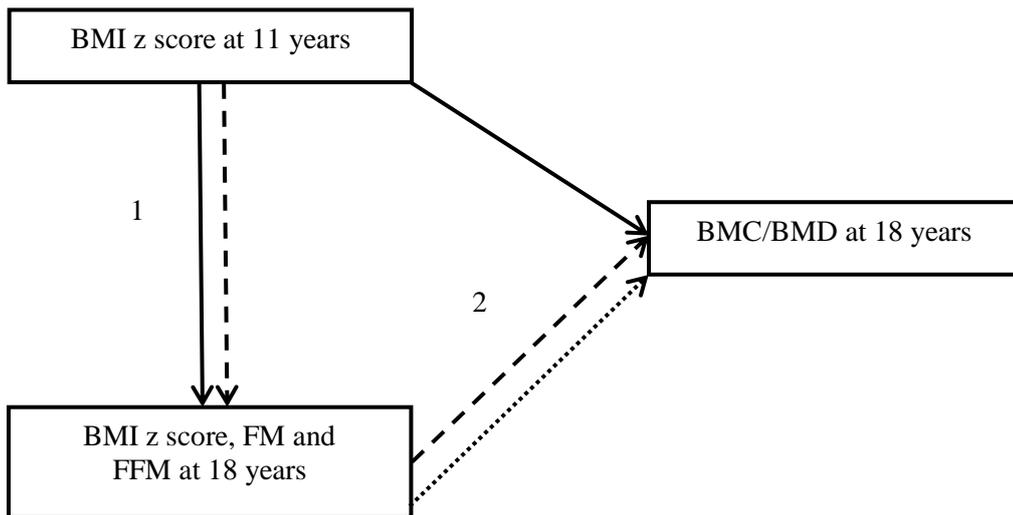
<sup>a</sup> Percentage of mediation cannot be calculated because of the negative association of FM with BMD in males

**Table 3** Association between body mass index (BMI) z score at 11 years old and bone mass at 18 years mediated by BMI z score, fat mass and fat free mass at 18 years. The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil. N= 1706 females.

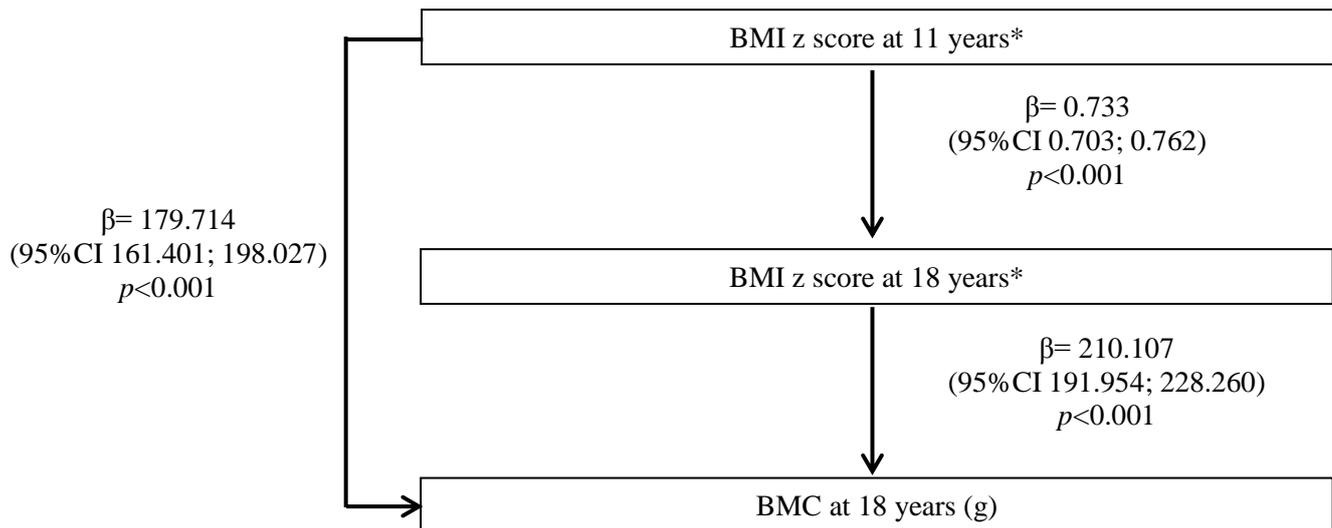
Association entre BMI z score at 11 y and BMC/BMD	BMC (g)		BMD (g/cm <sup>2</sup> )	
	$\beta$ (95%CI) p-value		$\beta$ (95%CI) p-value	
	Association	% mediation	Association	% mediation
Overall association <sup>(A)</sup>	179.945 (165.306; 194.584) <i>p</i> <0.001	n/a	0.029 (0.025; 0.033) <i>p</i> <0.001	n/a
Association after accounting for mediation by BMI z score at 18 years old <sup>(B)</sup>	56.571 (42.714; 70.428) <i>p</i> <0.001	68.6	0.011 (0.007; 0.015) <i>p</i> <0.001	62.1
Association after accounting for mediation by fat mass at 18 years old <sup>(B)</sup>	122.570 (109.272; 135.869) <i>p</i> <0.001	31.9	0.025 (0.022; 0.029) <i>p</i> <0.001	13.8
Association after accounting for mediation by fat free mass at 18 years old <sup>(B)</sup>	73.100 (61.975; 84.225) <i>p</i> <0.001	59.4	0.003 (0.0004; 0.006) <i>p</i> =0.024	89.7
Association after accounting for mediation by BMI z score, fat mass and fat free mass at 18 years old <sup>(B)</sup>	43.008 (30.140; 55.875) <i>p</i> <0.001	76.1	0.007 (0.003; 0.010) <i>p</i> <0.001	75.9

$\beta$  - Linear regression coefficient; 95%CI - 95% confidence interval; p-value from Wald's test; BMC - bone mineral content; BMD - bone mineral density; BMI - body mass index; BMI z score: according to the World Health Organization for children and teenagers from 5 to 19 years

% mediation = 100 - (Direct effect / Total effect)\*100, ie, 100 - (B / A)\*100

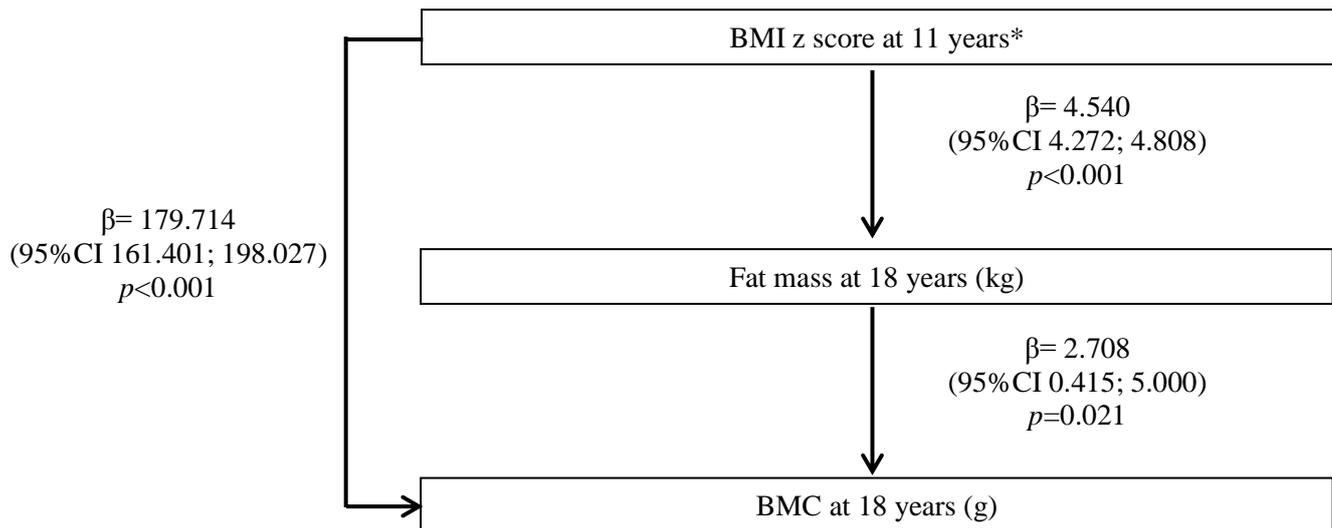


**Figure 1**



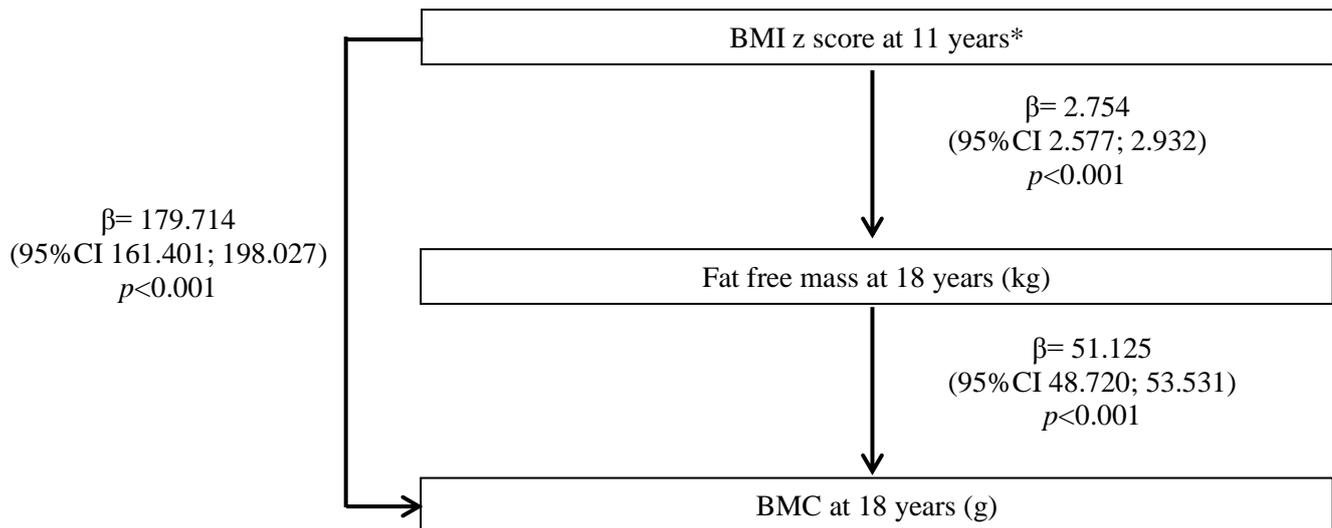
**Figure 2** Overall association between BMI z score at 11 and 18 years and bone mineral content at age 18 among males (N=1601). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

$\beta$  - linear regression coefficient; 95%CI - 95% confidence interval;  $p$ -value from Wald's test; BMI - body mass index; BMC - bone mineral content; \*According to the World Health Organization for children and teenagers from 5 to 19 years



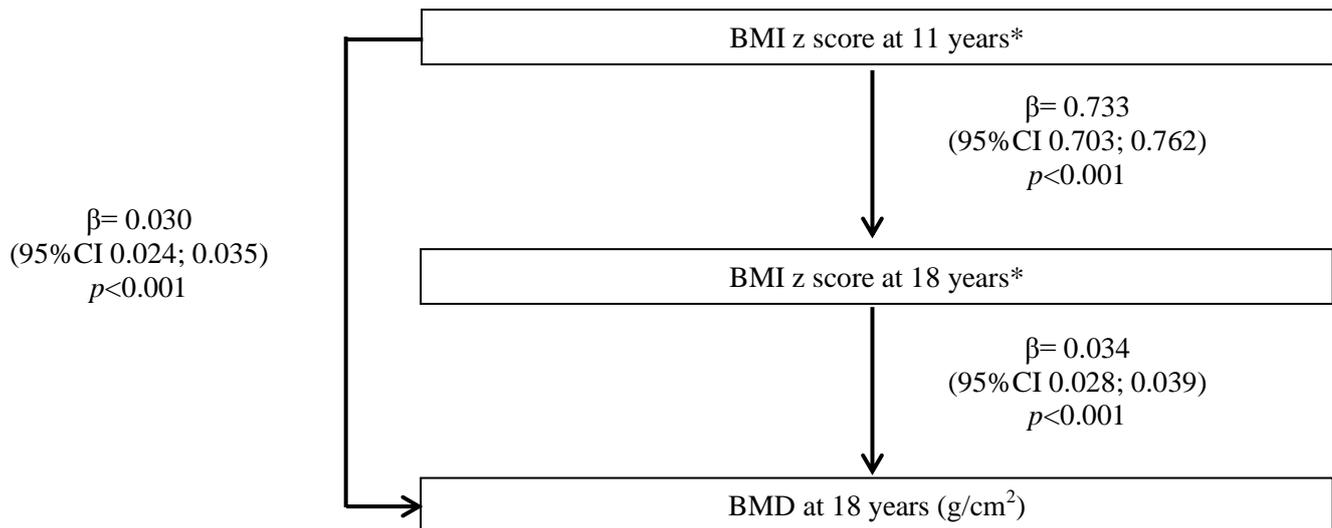
**Figure 3** Overall association between BMI z score at 11 years, fat mass and bone mineral content at age 18 among males (N=1601). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

$\beta$  - linear regression coefficient; 95%CI - 95% confidence interval;  $p$ -value from Wald's test; BMI - body mass index; BMC - bone mineral content; \*According to the World Health Organization for children and teenagers from 5 to 19 years



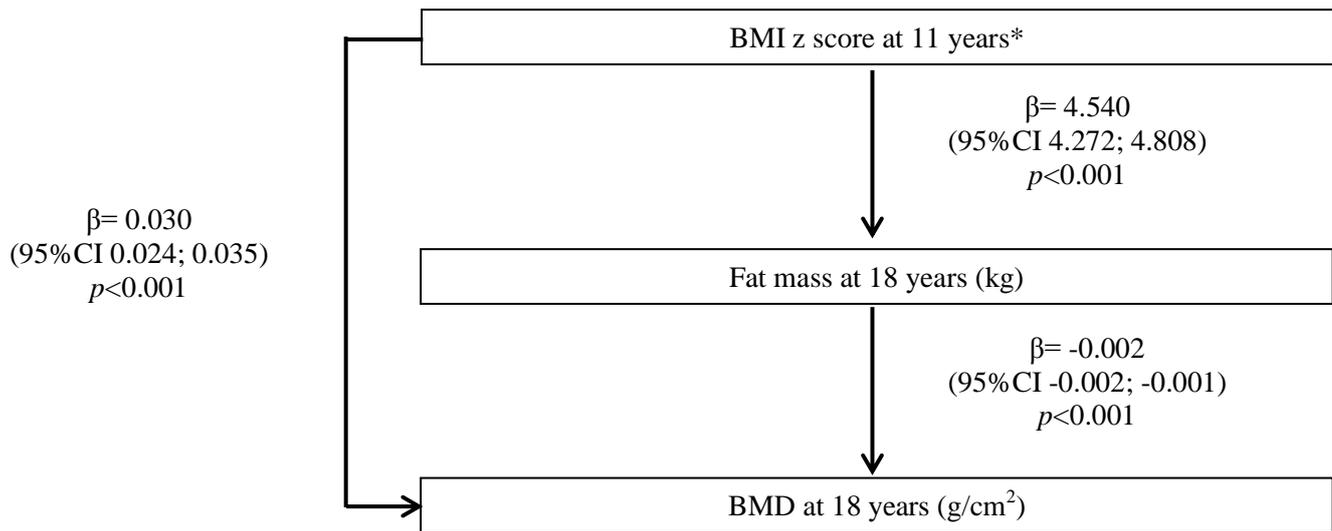
**Figure 4** Overall association between BMI z score at 11 years, fat free mass and bone mineral content at age 18 among males (N=1601). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

$\beta$  - linear regression coefficient; 95%CI - 95% confidence interval;  $p$ -value from Wald's test; BMI - body mass index; BMC - bone mineral content; \*According to the World Health Organization for children and teenagers from 5 to 19 years



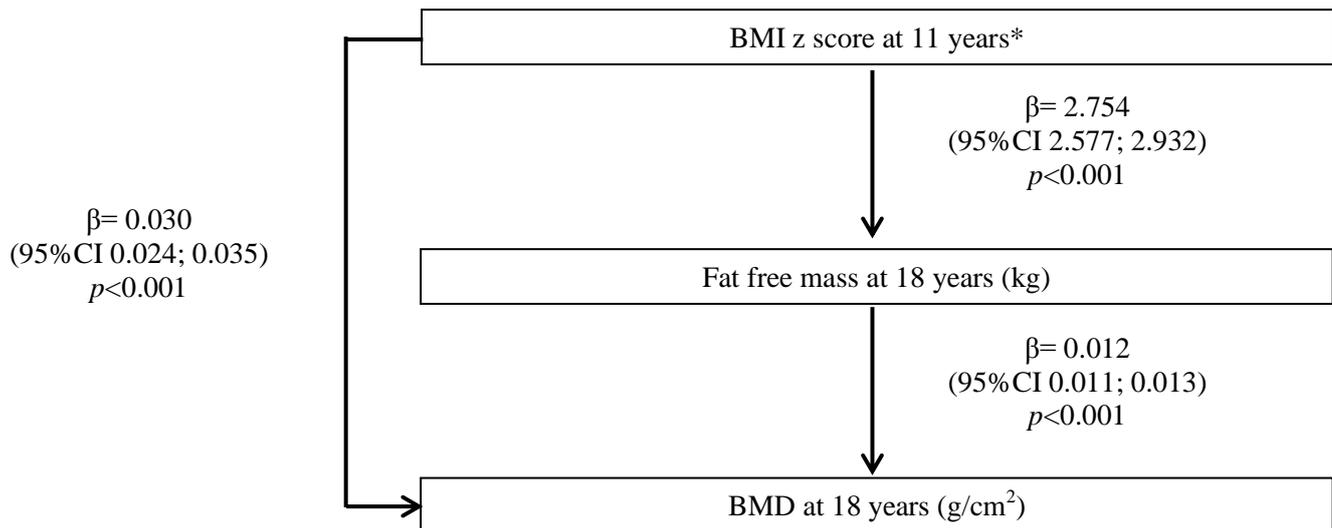
**Figure 5** Overall association between BMI z score at 11 and 18 years and bone mineral density at age 18 among males (N=1601). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

$\beta$  - linear regression coefficient; 95%CI - 95% confidence interval;  $p$ -value from Wald's test; BMI - body mass index; BMD - bone mineral density; \*According to the World Health Organization for children and teenagers from 5 to 19 years



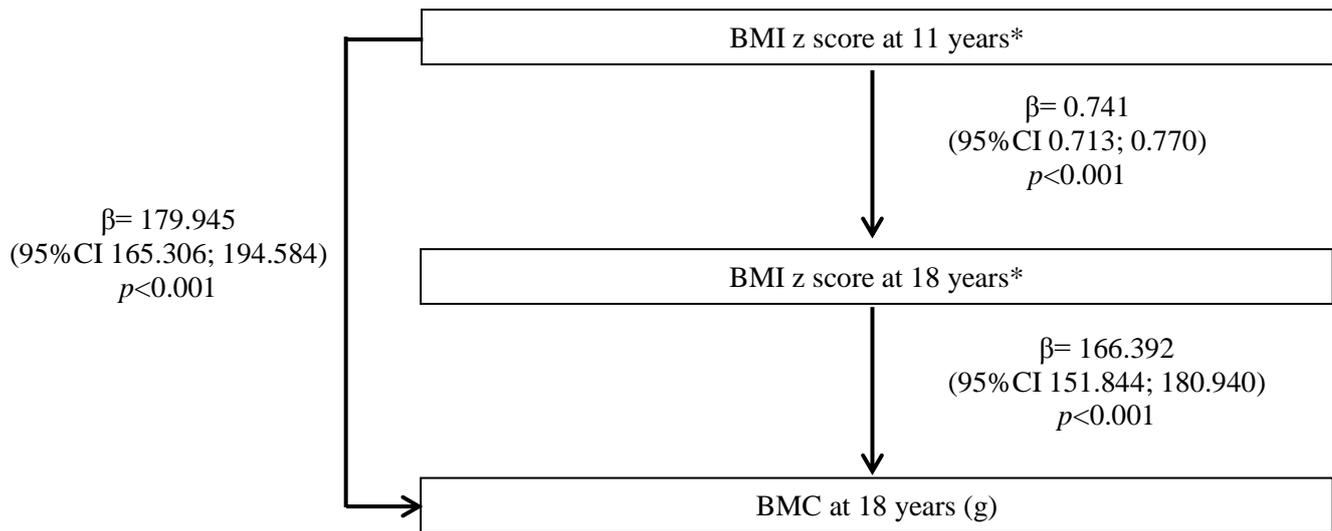
**Figure 6** Overall association between BMI z score at 11 years, fat mass and bone mineral density at age 18 among males (N=1601). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

$\beta$  - linear regression coefficient; 95%CI - 95% confidence interval;  $p$ -value from Wald's test; BMI - body mass index; BMD - bone mineral density; \*According to the World Health Organization for children and teenagers from 5 to 19 years



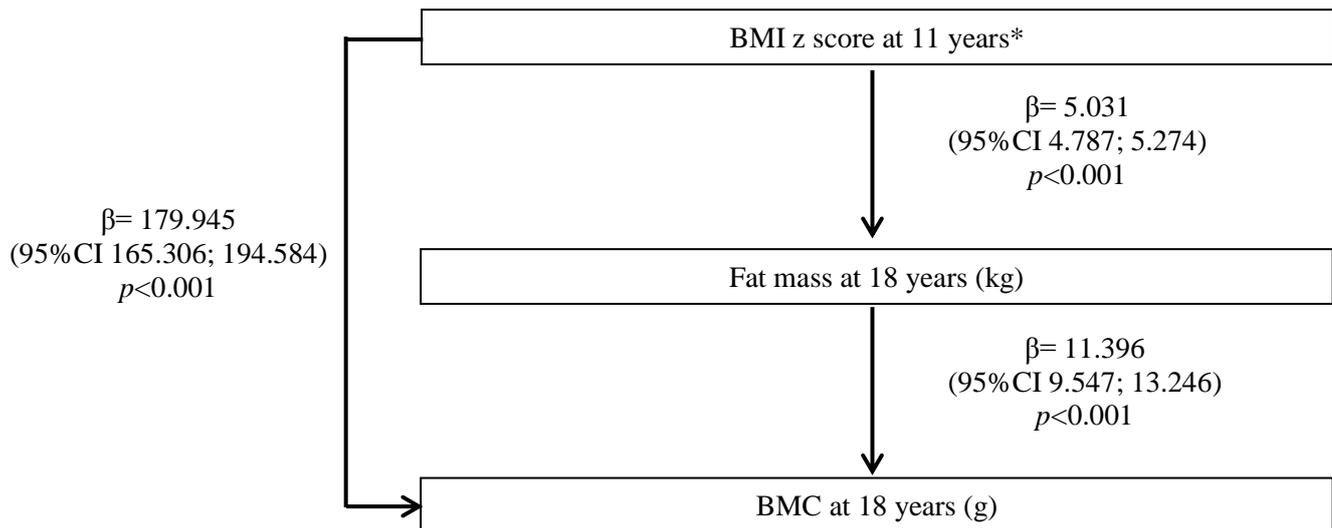
**Figure 7** Overall association between BMI z score at 11 years, fat free mass and bone mineral density at age 18 among males (N=1601). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

$\beta$  - linear regression coefficient; 95%CI - 95% confidence interval;  $p$ -value from Wald's test; BMI - body mass index; BMD - bone mineral density; \*According to the World Health Organization for children and teenagers from 5 to 19 years



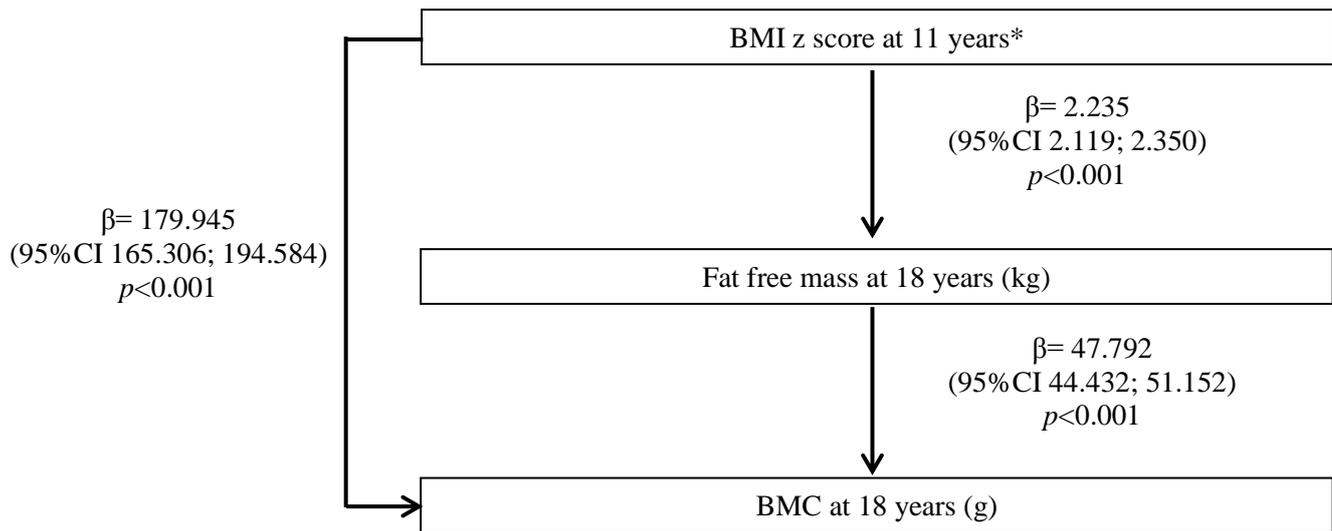
**Figure 8** Overall association between BMI z score at 11 and 18 years and bone mineral content at age 18 among females (N=1706). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

$\beta$  - linear regression coefficient; 95%CI - 95% confidence interval;  $p$ -value from Wald's test; BMI - body mass index; BMC - bone mineral content; \*According to the World Health Organization for children and teenagers from 5 to 19 years



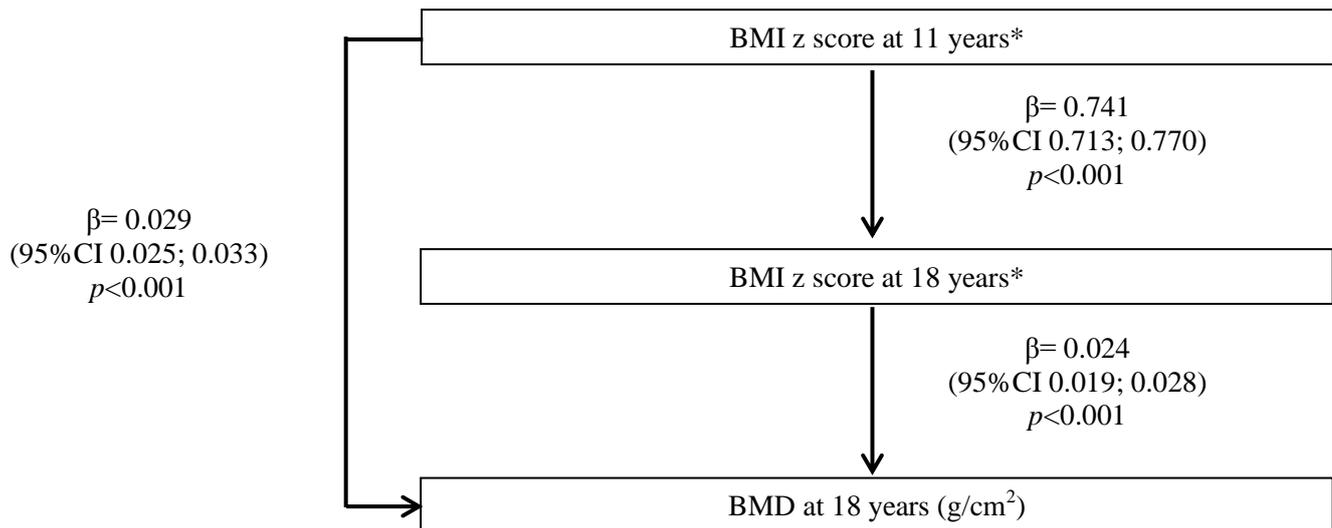
**Figure 9** Overall association between BMI z score at 11 years, fat mass and bone mineral content at age 18 among females (N=1706). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

$\beta$  - linear regression coefficient; 95%CI - 95% confidence interval;  $p$ -value from Wald's test; BMI - body mass index; BMC - bone mineral content; \*According to the World Health Organization for children and teenagers from 5 to 19 years



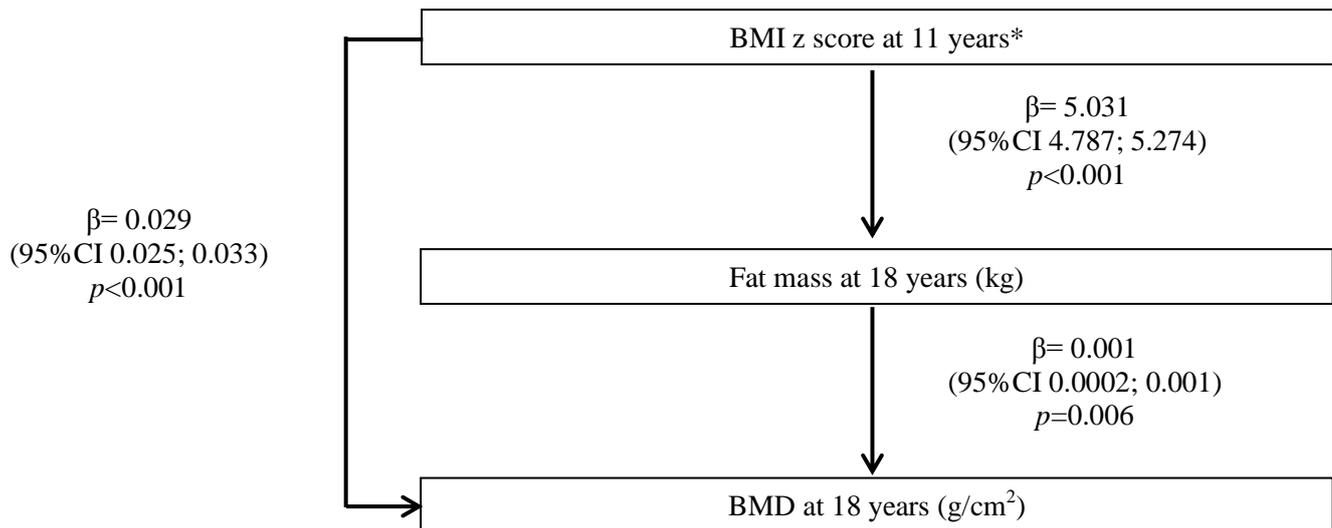
**Figure 10** Overall association between BMI z score at 11 years, fat free mass and bone mineral content at age 18 among females (N=1706). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

$\beta$  - linear regression coefficient; 95%CI - 95% confidence interval;  $p$ -value from Wald's test; BMI - body mass index; BMC - bone mineral content; \*According to the World Health Organization for children and teenagers from 5 to 19 years



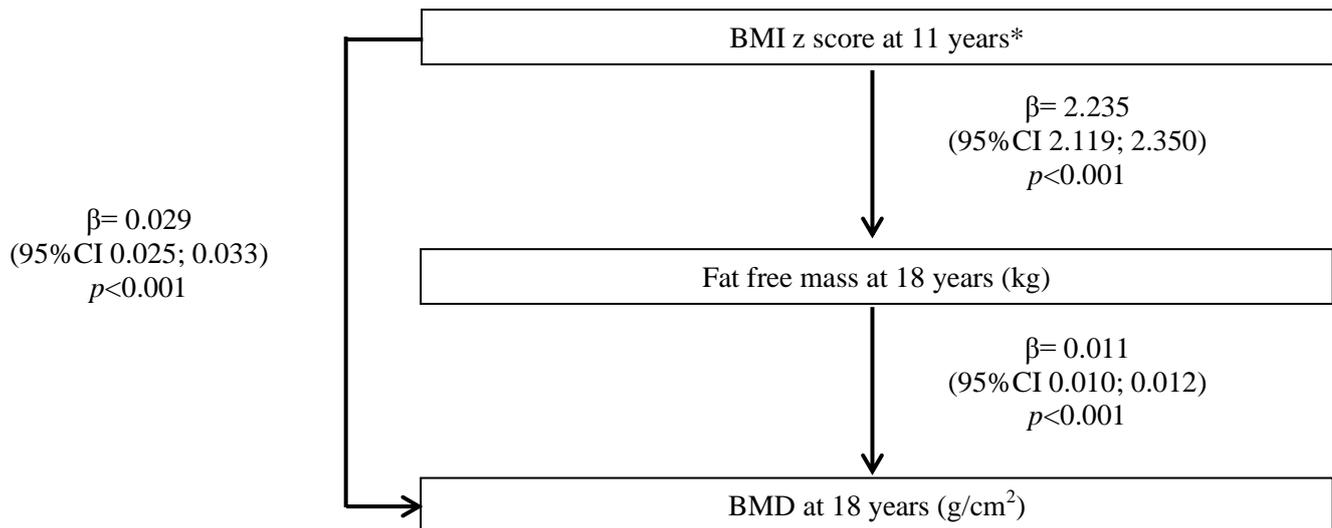
**Figure 11** Overall association between BMI z score at 11 and 18 years and bone mineral density at age 18 among females (N=1706). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

$\beta$  - linear regression coefficient; 95%CI - 95% confidence interval;  $p$ -value from Wald's test; BMI - body mass index; BMD - bone mineral density; \*According to the World Health Organization for children and teenagers from 5 to 19 years



**Figure 12** Overall association between BMI z score at 11 years, fat mass and bone mineral density at age 18 among females (N=1706). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

$\beta$  - linear regression coefficient; 95%CI - 95% confidence interval;  $p$ -value from Wald's test; BMI - body mass index; BMD - bone mineral density; \*According to the World Health Organization for children and teenagers from 5 to 19 years



**Figure 13** Overall association between BMI z score at 11 years, fat free mass and bone mineral density at age18 among females (N=1706). The 1993 Pelotas Birth Cohort. Brazil.

$\beta$  - linear regression coefficient; 95%CI - 95% confidence interval;  $p$ -value from Wald's test; BMI - body mass index; BMD - bone mineral density; \*According to the World Health Organization for children and teenagers from 5 to 19 years

#### **IV. Divulgação dos resultados para imprensa**

---

## **“Fatores nutricionais interferem na saúde óssea no início da vida adulta?”**

Este foi o questionamento que motivou a tese de Doutorado em Epidemiologia pela Universidade Federal de Pelotas da aluna Ludmila Correa Muniz. O trabalho da estudante, orientado pela professora Dra. Ana Maria Baptista Menezes, utilizou dados de diferentes visitas aos participantes das coortes de nascimentos de Pelotas de 1982 e 1993. No último acompanhamento, realizado em 2011-2012, cerca de 4100 adolescentes e 3700 adultos jovens compareceram à clínica localizada no Centro de Pesquisas em Saúde Amilcar Gigante para responderem questões sobre hábitos de vida e saúde em geral, além de realizarem alguns exames, dentre eles a densitometria óssea. O estudo avaliou o efeito da amamentação sobre a saúde óssea no início da vida adulta, bem como a relação entre parâmetros de estado nutricional e massa óssea no final da adolescência.

A primeira parte do estudo avaliou se o fato de o indivíduo receber leite materno nos primeiros anos de vida influenciava a saúde óssea aos 18 e 30 anos de idade. Para tanto, foram utilizados dados da coorte de nascimentos de Pelotas de 1982 e de uma subamostra da coorte de nascimentos de 1993. Os resultados mostraram que a amamentação não possui efeito em longo prazo sobre a saúde óssea das mulheres e, apesar de algum efeito positivo sobre a saúde óssea aos 18 anos nos homens, a maioria dos achados apontou para uma falta de associação entre amamentação e saúde óssea até a idade adulta.

Já a segunda parte do estudo avaliou a associação entre índice de massa corporal (IMC) aos 11 anos e saúde óssea aos 18 anos de idade, utilizando dados da coorte de nascimentos de Pelotas de 1993. O estudo examinou, ainda, os possíveis papéis do IMC, massa gorda (MG) e massa livre de gordura (MLG) aos 18 anos nessa associação. Os resultados mostraram que o IMC e a MLG aos 18 anos são mais importantes para a saúde óssea no final da adolescência do que o IMC aos 11 anos.

Esses achados mostram que uma boa saúde óssea no início da vida adulta, depende dos hábitos de vida contemporâneos, embora deva ser promovida desde os primeiros meses de vida.