

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA



Tese de Doutorado

DETERMINANTES DIETÉTICOS DA MASSA ÓSSEA NA VIDA ADULTA

Isabel Oliveira Bierhals

Pelotas, 2019

ISABEL OLIVEIRA BIERHALS

DETERMINANTES DIETÉTICOS DA MASSA ÓSSEA NA VIDA ADULTA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia junto à Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Epidemiologia.

Orientadora: Maria Cecília Formoso Assunção

Coorientadora: Juliana dos Santos Vaz

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B586d Bierhals, Isabel Oliveira

Determinantes dietéticos da massa óssea na vida adulta/
Isabel Oliveira Bierhals; Maria Cecília Formoso Assunção,
orientadora; Juliana dos Santos Vaz, coorientadora. —
Pelotas, 2019.

211 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em
Epidemiologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal
de Pelotas, 2019.

1. Epidemiologia. 2. Estudos de coortes. 3.
Absorciometria de Raios X. 4. Densidade óssea. 5.
Composição corporal. I. Assunção, Maria Cecília Formoso,
orient. II. Vaz, Juliana dos Santos, coorient. III. Título.

CDD : 614.4

Elaborada por Elionara Giovana Rech CRB: 10/1693

Banca examinadora

Prof^a. Dra. Ana Maria Baptista Menezes

Doutora em Epidemiologia

Universidade Federal de Pelotas

Revisor interno

Prof. Dr. Bernardo Horta Lessa

Doutor em Epidemiologia

Universidade Federal de Pelotas

Revisor interno

Prof.^a Dra. Silvana Paiva Orlandi

Doutora em Epidemiologia

Universidade Federal de Pelotas

Revisor externo

Prof^a. Dra. Maria Cecília Formoso Assunção

Doutora em Epidemiologia

Universidade Federal de Pelotas

Orientadora

Prof^a. Dra. Juliana dos Santos Vaz

Doutora em Nutrição

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Coorientadora

A minha avó Weleda.

(in memorian)

Agradecimentos

Agradeço, antes de tudo, a Deus pela oportunidade da vida. Por ser presença constante no meu cotidiano e por me guiar, iluminar e dar forças.

À minha mãe, por batalhar para me oferecer uma educação de qualidade e me ensinar que o que adquirimos em conhecimento é a nossa maior riqueza e nunca nos será subtraída. Reconheço tudo o que fez por mim, principalmente por incentivar e demonstrar que serei sempre capaz de tudo por maiores que sejam as dificuldades.

Agradeço, de forma póstuma, a minha avó Weleda (*in memoriam*), por me ensinar valores importantes e contribuir com minha educação. Da sua maneira, acompanhou parte desta jornada e sempre foi uma grande incentivadora.

Ao meu amor Paulo Ricardo, meu companheiro em todos os momentos, sejam bons ou ruins. Obrigada por me valorizar e erguer nos momentos em que mais precisei. Por estar ao meu lado e por sempre me fazer acreditar que daria certo.

À minha maravilhosa orientadora Maria Cecília Assunção. Talvez o agradecimento mais difícil a ser feito, principalmente porque resumi-la a minha orientadora é muito pouco perto de tudo que ela significou para mim durante esta caminhada. Tenho certeza que ela sente a importância que teve (e tem) não apenas na condução desta tese, mas também fora do ambiente de trabalho, como uma amiga muito especial. Agradeço, de todo meu coração, o apoio, a amizade, o carinho e principalmente a confiança em mim depositada.

À Juliana Vaz, minha coorientadora, pela disponibilidade e pelas grandes ideias e colaborações no decorrer de todo doutorado.

Gratidão ao professor Fernando Barros, pelo auxílio na proposta e condução do último artigo que compõe este volume. Foi uma ajuda em um momento crucial para a conclusão do meu doutorado.

Agradeço as minhas colegas e amigas Ana Paula Gomes, Luna Vieira e Simone Farias, por serem calmaria em meio aos momentos de tempestade. Amigas que o doutorado me proporcionou, que estiveram comigo durante este percurso e que levarei para toda vida.

Aos demais colegas com os quais convivi durante o doutorado, alguns desde o mestrado, agradeço a convivência, os momentos de estudo, bem como as discussões e debates científicos. Foi um privilégio e uma oportunidade de

aprendizado muito grande ter convivido com vocês.

Agradeço também a toda equipe da Coorte de 1993, que trabalhou em todas as fases do último acompanhamento. Em especial aos coordenadores Ana Menezes, Fernando Wehrmeister, Helen Gonçalves e Maria Cecília Assunção e às doutorandas Ana Paula Gomes, Andrea Wendt, Luna Vieira e Paula Oliveira. Ao longo de todo este percurso tive o privilégio de estudar com os melhores professores. Foram eles que me deram recursos e ferramentas para evoluir um pouco mais a cada dia. Meu agradecimento à vocês.

Aos funcionários do Centro de Pesquisas Epidemiológicas, por sempre me tratarem com carinho e pela prazerosa companhia durante esta caminhada.

À Universidade que me acolhe deste a graduação, quero deixar uma palavra de gratidão por ter me recebido com todas as condições que proporcionaram minha aprendizagem, evolução e crescimento.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos ao longo destes quatro anos.

RESUMO

BIERHALS, Isabel Oliveira. **Determinantes dietéticos da massa óssea na vida adulta**. 2019. 211f. Tese (Doutorado em Epidemiologia) – Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2019.

Ao longo da vida, a quantidade e qualidade de massa mineral óssea são determinadas por fatores genéticos e ambientais e também dependem de experiências anteriores, como estado nutricional, consumo alimentar, atividade física e níveis hormonais. Neste sentido, é proposto que a massa óssea em idade avançada tenha fatores determinantes no desenvolvimento inicial da vida, podendo resultar em um risco aumentado de fratura e osteoporose futura. Nesta tese, trabalhamos com dados da Coorte de 1993 de Pelotas e, foi investigado o efeito da alimentação, através do consumo de cálcio dietético, leite e de padrões de nutrientes, criados a partir de nutrientes que afetam a absorção de cálcio, nomeados de osso amigo (caracterizado pelo consumo de oxalato, proteína, cálcio e sódio) e osso não amigo (caracterizado pelo consumo de cafeína e com carga negativa de vitamina D) (Artigo 1) e do índice de massa corporal (IMC), índice de massa gorda (IMG), índice de massa magra (IMM) e obesidade (Artigo 2) da adolescência ao início da idade adulta sobre a Densidade Mineral Óssea (DMO) do corpo inteiro, coluna lombar e fêmur direito aos 22 anos de idade. Também foi avaliado o efeito do tamanho do corpo ao nascer e do crescimento em estatura e peso em diferentes períodos da infância e da adolescência sobre a DMO do corpo inteiro no início da idade adulta (Artigo 3). Em todos artigos a DMO foi obtida através da absorciometria de raios-x de dupla energia (DXA) e as análises foram estratificadas por sexo. O primeiro consta de uma análise longitudinal com os acompanhamentos realizados aos 18 e 22 anos de idade e obteve uma amostra de 3.109 indivíduos. Em relação ao consumo de leite entre os acompanhamentos, observamos efeito negativo para o sexo masculino, nas categorias de aumento e diminuição do consumo com DMO de corpo inteiro e DMO do fêmur. Para a ingestão de cálcio, observou-se associação positiva para o sexo feminino, na categoria aumento do consumo e DMO de corpo inteiro. Nas análises de padrões de nutrientes, homens com moderada ou diminuição da adesão ao padrão não amigo apresentaram aumento na DMO de corpo inteiro e

as mulheres que também tiveram um consumo diminuído apresentaram aumento na DMO da coluna lombar. O segundo artigo longitudinal, também foi realizado com os acompanhamentos dos 18 e 22 anos de idade, com uma amostra final de 2.968 participantes. Observou-se associação positiva dos três índices sobre os desfechos ósseos, porém com maior magnitude para o IMC, seguido pelo IMM, sugerindo-se que a maior parte do efeito positivo da massa corporal sobre o osso seja decorrente da quantidade de massa magra. O último artigo, sobre crescimento condicional e DMO do corpo inteiro, contou com dados dos acompanhamentos realizados ao nascimento, 1, 4, 11, 15 e 18, com desfecho ósseo medido aos 22 anos, totalizando 756 indivíduos. Os efeitos do ganho de peso e comprimento/altura foram examinados utilizando peso relativo condicional (CWh) e comprimento/altura condicional (CH). Para os homens, maior ganho de altura aos 4, 11 e 18 anos foi associado com maior DMO do corpo inteiro após análise ajustada, sendo o resultado com maior magnitude dos 11 anos. Para as mulheres, a DMO foi associada ao ganho de altura em todas as avaliações até os 15 anos, com maior medida de efeito aos 4 anos. Em relação ao peso corporal, para os homens, maior peso ao nascer e ganho aos 4, 15 e 18 anos repercutiu em maior DMO, com maiores coeficientes aos 18 anos. Para as mulheres, com exceção ao peso ao nascer, todas as variáveis de ganho de peso estiveram associadas à maior DMO, com maiores coeficientes observados para os 4 anos.

Palavras-chave: Estudos de coortes; Densidade óssea; Absorciometria de raios X; Alimentação; Composição corporal; Crescimento.

ABSTRACT

BIERHALS, Isabel Oliveira. **Dietary determinants of bone mass in adult life.** 2019. 211p. Thesis (Doctoral Thesis) – Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, Pelotas. 2019.

Throughout life, the quantity and quality of bone mineral mass are determined by genetic and environmental factors and also depend on previous experiences, such as nutritional status, food consumption, physical activity and hormone levels. In this sense, it is proposed that bone mass in advanced age has determinants in the initial development of life which may result in an increased risk of fracture and future osteoporosis. In this thesis, we worked with data from the 1993 Pelotas Cohort and investigated the effect of diet, through the consumption of dietary calcium, milk and nutrient patterns, created from nutrients that affect calcium absorption, named bone friendly (characterized by the consumption of oxalate, protein, calcium and sodium) and unfriendly pattern (characterized by consumption of caffeine and negatively charged vitamin D) (Article 1) and body mass index (BMI), fat mass index (FMI), lean mass index (LMI) and obesity (Article 2) from adolescence to early adulthood on bone mineral density (BMD) of the whole body, lumbar spine and right femur at 22 years of age. It was also evaluated the effect of body size at birth and growth in height and weight at different periods of childhood and adolescence on full body BMD in early adulthood (Article 3). In all articles BMD was obtained through dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) and analyzes were stratified by sex. The first one consists of a longitudinal analysis with the follow-ups performed at 18 and 22 years of age and it obtained a sample of 3,109 individuals. Regarding the consumption of milk between the follow-ups, we observed a negative effect for males, in the categories of increase and decrease of consumption with BMD of whole body and BMD of the femur. For the calcium intake, a positive association was observed for the female, in the category of increased consumption and BMD of the whole body. In the analysis of nutrient patterns, men with moderate or decreased adherence to the unfriendly pattern had an increase in the BMD of the whole body and women who also had a decreased consumption had an increase in lumbar spine BMD. The second longitudinal article was also performed with

the follow-ups at 18 and 22 years of age, with a final sample of 2,968 participants. A positive association of the three indices on bone outcomes was observed, but with a higher magnitude for BMI, followed by LMI, suggesting that most of the positive effect of body mass on bone is due to the amount of lean mass. The last article, about conditional growth and BMD of the whole body, had data from follow-ups performed at birth, 1, 4, 11, 15 and 18, with a bone outcome measured at 22 years of age, totaling 756 individuals. The effects of weight gain and length/height were examined using conditional relative weight (CWh) and conditional length/height (CH). For men, greater height gain at 4, 11 and 18 years was associated with greater BMD of the whole body after adjusted analysis, being the result with greater magnitude the one at 11 years. For women, BMD was associated with height gain in all assessments up to 15 years, with the greatest measure of effect at 4 years. Regarding body weight, for males, greater birth weight and gain at 4, 15 and 18 years had a higher BMD, with higher coefficients at 18 years. For women, except for birth weight, all variables of weight gain were associated with the highest BMD, with higher coefficients observed for the 4 years.

Keywords: Cohort Studies; Bone Density; X-Ray Absorptiometry; Feeding, Body composition, Growth.

Lista de Figuras

Figura 1: Divisão do esqueleto	10
Figura 2: Constituição do osso	11
Figura 3: Exemplo de aparelho de DXA utilizado para medir massa óssea	14
Figura 4: Exemplo de imagens obtidas pelo DXA: (A) Corpo inteiro; (B) Colo do fêmur; (C) Coluna lombar	15
Figura 5: Modelo conceitual de determinação hierárquica de CMO e DMO na vida adulta. Os níveis superiores determinam aqueles inferiores, seja passando por toda a cadeia (através de setas tracejadas), ou de forma indireta, através das setas cheias	23
Figura 6: Resumo dos acompanhamentos da coorte de nascimentos de 1993, Pelotas, RS	57
Figura 7: Avaliação da massa mineral óssea do corpo inteiro.	59
Figura 8: Posicionamento das pernas na avaliação da massa mineral óssea da coluna lombar.....	60
Figura 9: Posicionamento das mãos na avaliação da massa mineral óssea da coluna lombar.....	60
Figura 10: Posicionamento na avaliação da medida de massa mineral óssea do colo do fêmur.....	61
Figura 11: Layout do questionário de frequência alimentar digital autoaplicado utilizado no acompanhamento dos 18 anos; (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
..... 62

Figura 12: Modelo de análise da associação entre o consumo de leite e massa
óssea da Coorte de 1982 para o artigo original 1. A variável na caixa com linha
tracejada é a principal exposição de interesse..... 80

Figura 13: Modelo de análise da Coorte de 1993 para o artigo original 2..... 81

Lista de Quadros

Quadro 1: Descritores utilizados, estratégia de busca e síntese do número de artigos recuperados nas bases de dados.....	25
Quadro 2: Principais estudos que avaliaram a associação entre determinantes dietéticos na adolescência e saúde óssea na vida adulta.....	26
Quadro 3: Descrição dos potenciais mediadores e/ou fatores de confusão da coorte de 1982 que serão utilizados na análise do artigo original 1, para a associação entre consumo de leite e massa óssea.	64
Quadro 4: Descrição dos potenciais mediadores e/ou fatores de confusão da coorte de 1993 que serão utilizados na análise do artigo original 2.....	68
Quadro 5: Diferenças mínimas detectáveis entre categorias de exposições para DMO (g/cm ²) e CMO (g) do corpo inteiro	71

Lista de Tabelas

Tabela 1: Informações de alguns acompanhamentos dos nascidos vivos na cidade de Pelotas em 1982 56

Tabela 2: Alimentos que serão utilizados como variáveis independentes para a Coorte de 1982 e suas respectivas unidades de medida. 63

Tabela 3: Nutrientes e alimentos que serão utilizados como variáveis independentes para a Coorte de 1993 e suas respectivas unidades de medida 66

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
AO	Área óssea
CMO	Conteúdo mineral ósseo (g)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DLCO	Difusão pulmonar de monóxido de carbono
DMO	Densidade mineral óssea (g/cm ²)
DPA	Absorciometria de fóton duplo
DXA	Absorciometria de dupla energia de raios-X
GEE	Método de estimação de equação generalizada
IDRC	<i>International Development Research Center</i>
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IMC	Índice de massa corporal
LILACS	Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
MeSH	<i>Medical Subject Headings</i>
NPL	Não persistência da lactase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PL	Persistência da lactase
PMO	Pico de massa óssea
PPGE	Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia
PRONEX	Programa de Apoio a Núcleos de Excelência
PTH	Paratormônio
QFA	Questionário de frequência alimentar
R24H	Recordatório de 24 horas
RM	Randomização mendeliana
SEM	Modelagem de equações estruturais
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SPA	Absorciometria de fóton único
SRQ	<i>Self-Reporting Questionnaire</i>
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
VOP	Velocidade da onda de pulso
WoS	<i>Web of Science</i>

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
PROJETO DE PESQUISA	4
Resumo.....	5
Artigos planejados.....	6
1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Conceito, divisão e funções do esqueleto	9
1.2 Composição e anatomia do osso	10
1.3 Maturação do esqueleto e pico de massa óssea.....	12
1.4 Métodos para medir massa óssea.....	13
2 MARCO TEÓRICO	16
2.1 Fatores associados à massa mineral óssea.....	16
2.2 Fatores dietéticos e massa óssea	19
2.3 Modelo conceitual de determinação hierárquica	23
3 REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1 Características dos artigos incluídos na revisão	45
3.2 Efeito dos determinantes dietéticos na saúde óssea.....	46
3.2.1 Determinantes dietéticos abordados na forma de padrões alimentares	46
3.2.2 Determinantes dietéticos abordados na forma de alimentos	46
3.2.2.1 Frutas e vegetais	46
3.2.2.2 Soja e isoflavonas	47
3.2.2.3 Leite.....	47
3.2.3 Determinantes dietéticos abordados na forma de alimentos e nutrientes.....	47
3.2.4 Determinantes dietéticos abordados na forma de nutrientes	47
3.2.4.1 Cálcio.....	47
3.2.4.2 Fósforo.....	48
3.2.4.3 Relação cálcio/fósforo	49
3.2.4.4 Proteína	49
3.2.4.5 Relação cálcio/proteína	49
3.2.4.6 Vitamina D.....	50

3.2.4.7 Cafeína	50
3.3 Síntese dos resultados	50
3.4 Persistência da lactase e massa óssea.....	51
4 JUSTIFICATIVA	52
5 OBJETIVOS	53
5.1 Objetivo geral	53
5.2 Objetivos específicos.....	53
6 HIPÓTESES	54
7 METODOLOGIA.....	55
7.1 Delineamento	55
7.2 Metodologia das Coortes de Nascimentos de Pelotas/RS	55
7.2.1 Coorte de Nascimentos de 1982	55
7.2.2 Coorte de Nascimentos de 1993	56
7.3 População em estudo.....	57
7.3.1 Coorte de Nascimentos de 1982	57
7.3.2 Coorte de Nascimentos de 1993	57
7.4 Critérios de inclusão	57
7.4.1 Coorte de Nascimentos de 1982	57
7.4.2 Coorte de Nascimentos de 1993	58
7.5 Critérios de exclusão	58
7.6 Instrumentos.....	58
7.6.1 Instrumento para coleta do desfecho	58
7.6.2 Instrumento para coleta das exposições	61
7.6.2.1 Coorte de Nascimentos de 1982	61
7.6.2.2 Coorte de Nascimentos de 1993	61
7.7 Principais variáveis a serem estudadas	62
7.7.1 Variáveis dependentes	62
7.8 Coorte de Nascimentos de 1982	63
7.8.1 Variável independente.....	63
7.8.2 Potenciais mediadores e/ou fatores de confusão	63
7.9 Coorte de Nascimentos de 1993	66
7.9.1 Variáveis independentes	66
7.9.1.1 Exposições como alimentos e nutrientes	66
7.9.1.2 Exposições como padrões alimentares	66

7.9.2 Potenciais mediadores e/ou fatores de confusão	67
7.10 Cálculo de tamanho de amostra	70
7.11 Seleção e treinamento dos entrevistadores	72
7.12 Logística e coleta de dados	72
7.12.1 Coorte de Nascimentos de 1982	72
7.12.2 Coorte de Nascimentos de 1993	73
7.13 Estudo piloto	74
8 SUPERVISÃO E CONTROLE DE QUALIDADE	76
9 PROCESSAMENTO DOS DADOS	77
10 ANÁLISE DOS DADOS	78
10.1 Artigo de revisão	78
10.2 Artigo original 1	78
10.3 Artigo original 2	79
11 ASPECTOS ÉTICOS	82
12 CRONOGRAMA	83
13 DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS	84
14 ORÇAMENTO E FINANCIAMENTO	85
15 REFERÊNCIAS	86
ANEXOS	102
ANEXO 1	102
ANEXO 2	108
ANEXO 3	111
ALTERAÇÕES DO PROJETO DE PESQUISA	126
ARTIGOS	129
Artigo 1. Milk consumption, dietary calcium intake and nutrient patterns from adolescence to early adulthood and its effect on bone mass: The 1993 Pelotas Birth Cohort, Brazil	130
Artigo 2. Associations between body mass index and body composition and bone density in young adults: Findings from a South Brazilian Cohort.....	160
Artigo 3. Growth from birth to adolescence and bone mineral density in young adults: The 1993 Pelotas Birth Cohort.....	185

APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

Esta tese foi elaborada conforme as normas do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia (PPGE) da Universidade Federal de Pelotas.

Inicialmente será apresentado o projeto de tese, o qual foi qualificado em Agosto de 2016 e encontra-se em conformidade com as sugestões propostas pela banca naquele momento. Logo após, são apresentadas modificações do projeto juntamente com os motivos pelos quais elas foram realizadas.

Em sequência, está disponível o relatório do acompanhamento dos 22 anos da Coorte de Nascimentos de 1993, realizado entre 2015 e 2016, no qual a autora realizou seu trabalho de campo.

Logo após, são apresentados três artigos que compõem a tese de doutorado e estão no formato requerido pelas revistas as quais foram ou serão submetidos. Todos foram realizados com dados da coorte de 1993. O primeiro artigo, aceito para publicação no periódico *Cadernos de Saúde Pública*, é intitulado “*Milk consumption, dietary calcium intake and nutrient patterns from adolescence to early adulthood and its effect on bone mass: The 1993 Pelotas Birth Cohort, Brazil*” e apresenta a relação entre as três maneiras de se avaliar a alimentação (nutriente, alimento e padrões alimentares, respectivamente cálcio dietético, leite e padrões de nutriente osso amigo e osso não amigo) aos 18 e 22 anos, sobre a densidade mineral óssea (DMO) do corpo inteiro, coluna lombar e fêmur direito aos 22 anos de idade. O segundo artigo, submetido a *BMC Musculoskeletal Disorders*, é intitulado “*Associations between body mass index and body composition and bone density in young adults: Findings from a South Brazilian Cohort*” e verificou a relação entre índice de massa corporal, índice de massa gorda, índice de massa magra e presença de obesidade também aos 18 e 22, sobre a DMO do corpo inteiro, coluna lombar e fêmur direito aos 22 anos de idade. O terceiro artigo avalia o efeito do ganho de peso e comprimento/altura utilizando peso relativo condicional (CWh) e comprimento/altura condicional (CH) sobre a DMO do corpo inteiro, contou com dados dos acompanhamentos realizados ao nascimento, 1, 4, 11, 15 e 18, com desfecho ósseo medido aos 22 anos. Está intitulado “*Growth from birth to adolescence and bone mineral density in young adults: The 1993 Pelotas Birth Cohort*”.

Ao final do volume, está disponível uma nota à imprensa, para divulgação da pesquisa à população geral.

PROJETO DE TESE

RESUMO

O osso é um tecido complexo que desempenha uma série de funções essenciais no organismo humano. Desta forma, a manutenção da saúde óssea é fundamental para o seu correto desempenho. Vários são os fatores descritos na literatura como potenciais determinantes da massa óssea, podendo ser agrupados em duas principais categorias: fatores não modificáveis e modificáveis. Dentre os fatores modificáveis encontram-se aqueles relacionados ao estilo de vida, como a alimentação. É sabido que muitos dos nutrientes, alimentos e componentes alimentares que consumimos como parte da alimentação diária podem ter um impacto positivo ou negativo sobre a saúde óssea, em todas as fases da vida. Recentemente, tem sido reconhecida a importância de avaliar, além de nutrientes e componentes alimentares, os possíveis efeitos conjuntos da dieta, a partir da análise de padrões alimentares. Ainda, a literatura também tem relatado a possibilidade de estudar variantes genéticas como variáveis instrumentais associadas com exposições modificáveis de interesse, para estimar a relação causal entre essas exposições e desfechos em saúde, independentemente de confusão. Desta forma, o presente estudo pretende avaliar a relação entre alimentação (na forma de nutrientes, alimentos e padrões alimentares) e medidas de massa mineral óssea na vida adulta. O estudo terá delineamento longitudinal e a população em estudo compreenderá os participantes das coortes de nascimentos de Pelotas de 1982 e 1993. Ambas as coortes apresentam dados sobre alimentação coletados a partir de questionário de frequência alimentar (QFA) aplicado aos 30 anos para a coorte de 1982 e aos 15, 18 e 22 anos de idade para a coorte de 1993. A coorte de 1982 possui dados genéticos provindos de varredura genômica conduzida no DNA coletado aos 22 anos, o que permitirá a realização da randomização mendeliana (RM). As medidas de massa óssea (conteúdo e densidade mineral óssea do corpo inteiro, coluna lombar e colo do fêmur) foram obtidas através de absorciometria de dupla energia de raios-X (DXA) aos 30 anos na coorte de 1982 e aos 22 anos de idade da coorte de 1993.

ARTIGOS PLANEJADOS

Artigo de revisão: Fatores dietéticos e saúde óssea: revisão sistemática da literatura.

Artigo original 1: Persistência da lactase e massa óssea: análise de randomização mendeliana na coorte de nascimentos de 1982 de Pelotas, Brasil.

Artigo original 2: Determinantes dietéticos da massa óssea aos 22 anos de idade: análise prospectiva da coorte de nascimentos de 1993 de Pelotas, Brasil.

1. INTRODUÇÃO

O osso é um tecido complexo, fundamental por sua função de sustentação do esqueleto, continuamente remodelado com o intuito de manter sua resistência e conservar seu conteúdo mineral, em resposta a mudanças físicas e biomecânicas sofridas pelo corpo humano¹. Para ser considerado saudável, o osso necessita estar apto para desempenhar sua finalidade, dispor de mecanismos para sua manutenção e reparação e não falhar durante atividades fisiológicas normais².

A saúde óssea é avaliada a partir da quantificação do conteúdo mineral ósseo (CMO) e da densidade mineral óssea (DMO). O CMO pode ser definido como a quantidade de mineral contido em uma determinada projeção do osso enquanto que a DMO é a quantidade de mineral contido a cada centímetro quadrado desse osso³.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu como normalidade, em mulheres menopausadas e homens com mais de 50 anos, a DMO até -1 desvio padrão em relação a valores médios observados em indivíduos jovens saudáveis com mesma raça e sexo (*T-score*)⁴. Já para a população mais jovem, a DMO acima de -2,0 desvios padrão classifica os indivíduos como "dentro dos limites esperados para a idade" (*Z-score*)⁵. Quando o tecido ósseo perde a capacidade de realizar adequadamente suas funções fisiológicas, ocorre uma diminuição da massa óssea, acarretando o aumento do risco de doenças osteometabólicas^{6, 7}, entre as quais a osteoporose é a mais prevalente⁸.

A osteoporose é um distúrbio caracterizado pela diminuição da DMO, com deterioração da microarquitetura do osso, levando a um aumento da fragilidade esquelética e do risco de fraturas⁴. Apesar de ser uma doença comumente relacionada a pessoas idosas, aproximadamente 60% do risco de desenvolver osteoporose pode ser explicado pela aquisição de massa óssea durante a infância e adolescência⁹.

Alguns períodos são considerados fundamentais para aquisição e manutenção da massa óssea. A gestação e o período pós menopausal são períodos em que ocorre a perda óssea e o aumento da taxa de perda, respectivamente^{10, 11}. Já a adolescência é a fase de grande expansão da massa

óssea em função do estirão de crescimento e da alta taxa de mineralização que se evidenciam nesse período da vida¹².

Neste sentido, estratégias para aumentar a massa óssea na adolescência têm sido sugeridas como forma de prevenção da osteoporose, visto que esta fase representa a última oportunidade para aumentar substancialmente a massa óssea antes da sua respectiva consolidação¹³. No entanto, a acumulação e manutenção da massa mineral óssea é um processo multifatorial, influenciado por idade, sexo, hereditariedade e por fatores de vida potencialmente modificáveis¹⁴⁻¹⁶. Desta forma, a aquisição de hábitos saudáveis como a prática regular de atividade física, o consumo moderado de bebidas alcoólicas e não fumar podem atuar positivamente sobre a massa óssea em todas as fases da vida^{3, 17}.

Fatores dietéticos também são considerados como sendo de particular relevância para a saúde óssea^{15, 18}. Além do cálcio e da vitamina D, já consagrados na literatura devido a importância para a manutenção do osso, vitaminas e minerais também desempenham papel relevante, tanto na formação, quanto na manutenção do esqueleto¹⁹. Por outro lado, o excesso de cafeína e sódio, por exemplo, pode ser potencialmente prejudicial¹⁴. Desta forma, a alimentação adequada atua no sentido de auxiliar na formação da massa óssea durante o crescimento, bem como na sua manutenção ao longo da vida, culminando em menores perdas em longo prazo²⁰. Apesar da relevância do tema, a associação entre alimentação e massa óssea é complexa, principalmente pelo fato das refeições consistirem de uma ampla variedade de alimentos e nutrientes com suscetibilidade de interação e confusão entre eles, causados, principalmente, porque, geralmente a prática alimentar se dá a partir da ingestão combinada de um conjunto de alimentos²¹. Além disso, muitos estão altamente correlacionados, tornando difícil isolar seus efeitos²¹. Neste sentido, o uso de variantes genéticas como *proxies* de exposições modificáveis, a fim de melhorar a inferência causal em estudos observacionais através da aplicação do princípio da randomização mendeliana (RM)²², tem crescido rapidamente²³⁻²⁶, principalmente porque não são propensos a confusão ou causalidade reversa²⁷.

Frente a isso, o presente projeto de pesquisa se propõe a avaliar a relação entre fatores dietéticos e saúde óssea na vida adulta.

Como forma de contextualizar o tema, serão abordados a seguir, ainda na introdução, aspectos conceituais do esqueleto, assim como divisão e funções, composição e anatomia do osso, maturação e pico de massa óssea e métodos para medir massa óssea. Posteriormente, será apresentado o marco teórico, com os fatores determinantes da massa óssea, incluindo a alimentação e a revisão de literatura, que focará nos efeitos dos fatores dietéticos – nutrientes, alimentos e padrões alimentares – na saúde óssea.

1.1 Conceito, divisão e funções do esqueleto

O sistema esquelético consiste em ossos e cartilagens²⁸ que formam o arcabouço rígido do corpo humano²⁹. O esqueleto é composto por 206 ossos agrupados em duas principais categorias: axial e apendicular (Figura 1). O esqueleto axial constitui o eixo do corpo e é composto por cerca de 80 ossos da cabeça, pescoço e tronco. O esqueleto apendicular conecta-se ao esqueleto axial e contém os 126 ossos dos membros superiores e inferiores²⁹.

Os ossos proporcionam o suporte estrutural para o resto do corpo, permitem movimento e locomoção fornecendo alavancas para os músculos, protegem os órgãos vitais internos, como o encéfalo, a medula espinhal e o coração, garantem a manutenção da homeostase mineral e do equilíbrio ácido-base e fornecem o ambiente para a hematopoiese no interior da medula³⁰.

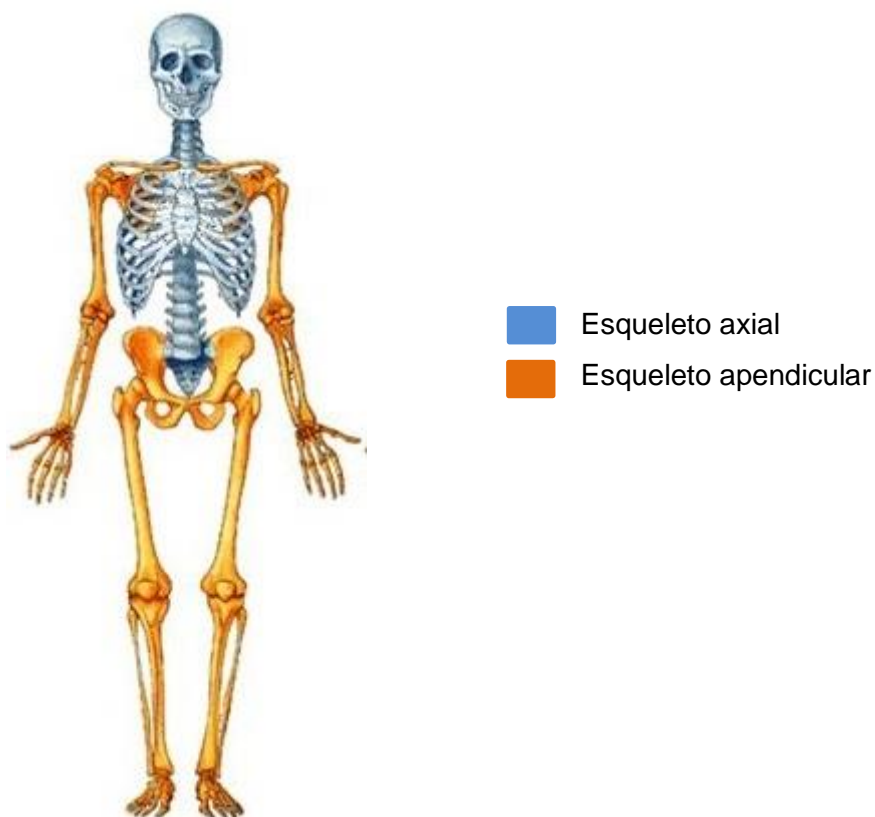


Figura 1: Divisão do esqueleto.

1.2 Composição e anatomia do osso

Os ossos são constituídos, basicamente, por matéria orgânica ou extracelular e matéria inorgânica ou mineral. A matéria inorgânica é formada por cálcio, fosfato (na forma de cristais de hidroxiapatita) e carbonato, constituindo cerca de 70% do peso ósseo corporal; 5% a 8% é formado por água e 22% a 25% correspondem à matriz orgânica, que é formada principalmente por colágeno tipo I, mas inclui uma pequena porcentagem de proteínas não colágenas³¹.

Anatomicamente, o tecido ósseo é composto pela substância óssea compacta ou cortical e pela substância massa óssea esponjosa ou trabecular²⁹. A massa óssea compacta é encontrada na diáfise ou corpo dos ossos longos e nas superfícies dos demais ossos, constituindo um revestimento denso e rijo. A massa óssea esponjosa é porosa e encontra-se nas extremidades (epífise) dos ossos longos e no interior dos demais ossos (Figura 2)²⁹.

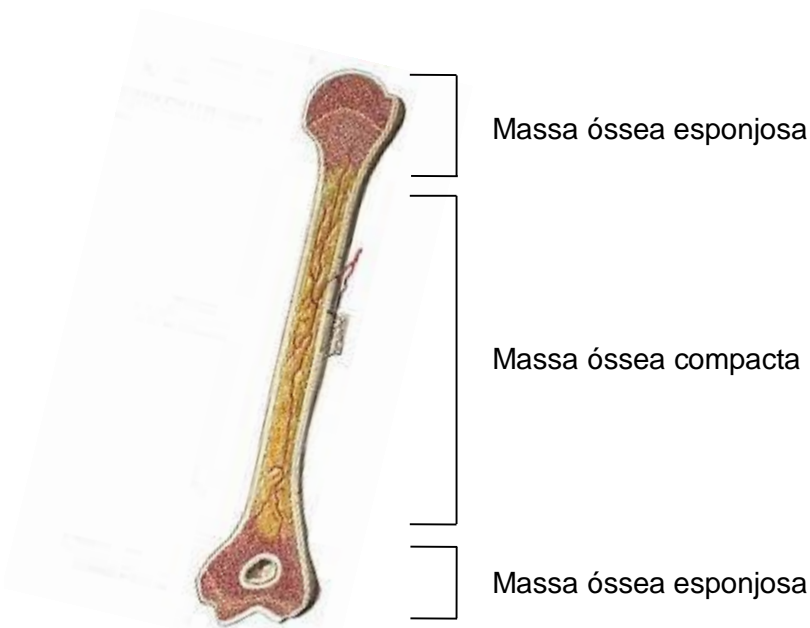


Figura 2: Constituição do osso.

O tecido ósseo é formado por três tipos de células (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos). Os osteoblastos produzem a matriz óssea, os osteócitos estão localizados dentro da matriz óssea e têm papel fundamental na manutenção da integridade dessa matriz e, os osteoclastos são responsáveis pela remodelação óssea^{1, 32}.

A remodelação óssea é um processo contínuo no qual o tecido ósseo maduro é removido e subsequentemente substituído por um tecido novo³³. Esse evento ocorre durante toda a vida adulta do indivíduo, sendo responsável pela renovação do esqueleto e manutenção da sua integridade anatômica e estrutural³⁴. O ciclo de remodelação é composto por quatro fases sequenciais. Inicialmente ocorre a diferenciação e ativação dos osteoclastos. Posteriormente, na fase de reabsorção, ocorre a degradação tanto dos componentes minerais quanto orgânicos do osso. Na terceira fase, de reversão, ocorre uma preparação da superfície óssea para novos osteoblastos iniciarem a última etapa, na qual ocorre a formação e mineralização da nova matriz óssea¹.

Três hormônios estão diretamente envolvidos no controle do metabolismo do cálcio: o paratormônio (PTH), a 1,25-diidroxitamina [1,25(OH)₂D] e a calcitonina. O PTH, um hormônio secretado pela glândula paratireoide, atua no aumento da calcemia. Este hormônio promove a desmineralização óssea,

aumentando os níveis de cálcio no sangue, além da diminuição da sua excreção através da urina e da estimulação da síntese de 1,25-diidroxivitamina D¹. A 1,25(OH)₂D induz a diferenciação dos osteoclastos, que proliferam e aumentam a reabsorção óssea, a partir de uma ação indireta, ativando inicialmente os osteoblastos, os quais, através de fatores locais, ativam os osteoclastos^{1,33}. Este hormônio atua também nas glândulas paratireóides através de receptores específicos, diminuindo a secreção de PTH³⁵. Já a calcitonina, produzida nas células parafoliculares da tireoide, atua sobre os osteoclastos, diminuindo sua atividade e, conseqüentemente, a reabsorção óssea e, portanto, a mobilização de cálcio do osso, apresentando ação antagônica a do PTH³⁶.

1.3 Maturação do esqueleto e pico de massa óssea

Durante a infância e adolescência, a produção óssea predomina sobre a reabsorção, enquanto que na idade adulta os dois processos se equilibram. Com o passar dos anos, no entanto, as situações se invertem e a reabsorção torna-se predominante sobre a produção óssea, principalmente nas mulheres, a partir dos 45-50 anos³⁷.

O processo de maturação do esqueleto se inicia nas primeiras semanas de vida do embrião e se estende até a idade adulta³⁸. Este processo caracteriza-se pela produção de uma matriz proteica que, em nível extracelular, é mineralizada sob a ação de enzimas específicas. Esta matriz sofre um processo cíclico de produção e reabsorção óssea, cujo equilíbrio se modifica ao longo da vida³⁸.

A deposição mineral óssea do feto inicia-se durante a gravidez, com dois terços do seu acúmulo ocorrendo durante o terceiro trimestre da gestação³⁹. Já no período que compreende a infância e a adolescência, ocorre o crescimento físico longitudinal, com altos índices de mineralização da matriz óssea^{40, 41}. Acredita-se que em torno de 50% do aumento total da DMO ocorre entre os primeiros meses de vida e o início do desenvolvimento puberal⁴², com 25% da massa óssea adquirida durante o período de dois anos que circunda o pico de altura^{42, 43}.

Aos 18 anos de idade, aproximadamente 90% da massa óssea terá sido acumulada⁴⁴. Ao término da puberdade, o aumento anual de DMO, que até então apresentava forte ascensão, passa a se tornar mais lento³. O restante do

acúmulo da DMO acontece durante a adolescência tardia, até a idade de 21-25 anos⁴⁵. Quando o indivíduo atinge esta idade, a DMO se estabiliza e é justamente nessa fase que o indivíduo alcança seu pico de massa óssea (PMO)³. Este é definido como a quantidade máxima de massa óssea que um indivíduo acumula desde o nascimento até a maturidade do esqueleto, ou seja, o valor máximo de massa óssea atingida antes do início de sua perda³.

A idade exata em que a acumulação óssea atinge um platô varia com a região do esqueleto e com a forma como a massa óssea é medida. O pico de massa óssea dos sítios do fêmur proximal ocorre em torno dos 20 anos de idade, enquanto que a massa óssea corporal total atinge seu pico entre 6 e 10 anos mais tarde⁴⁶. No entanto, os ossos do crânio nunca atingem um pico, aumentando sua massa ao longo da vida. Outros ossos, como as vértebras, continuam a aumentar de diâmetro⁴⁶⁻⁴⁸.

1.4 Métodos para medir massa óssea

O tecido ósseo é tradicionalmente avaliado de forma estática e pontual por diferentes métodos de imagem⁴³. Dentre os métodos comumente utilizados estão a absorciometria de fóton único (SPA), absorciometria de fóton duplo (DPA), absorciometria de raio-X de dupla energia (DXA)^{49, 50}, tomografia computadorizada quantitativa e ultrassonografia⁵⁰.

A técnica de DXA (Figura 3) será descrita, tendo em vista que é aquela considerada mais adequada para medir DMO⁵⁰. Esta técnica, desenvolvida em meados da década de 1980, aproveita a alta sensibilidade do cálcio na absorção de raios-X para avaliar as quantidades relativas de osso e outros tecidos moles, a fim de calcular o CMO e, por conseguinte, a DMO⁵⁰. O CMO é medido em gramas e a área óssea (AO), em centímetros quadrados. Já a DMO, em gramas por centímetro quadrado, é calculada através da divisão da CMO pela AO⁵¹.



Figura 3: Exemplo de aparelho de DXA utilizado para medir massa óssea.

O DXA propicia uma análise altamente precisa e com baixa exposição à radiação, sendo adequada para a avaliação em todas as faixas etárias⁵². Durante a realização do exame, o detector, move-se juntamente com a fonte de radiação, passando através do corpo. O *software* calcula a densidade óssea de cada região analisada e os dados são utilizados para a construção de uma imagem (Figura 4)⁴⁹.

O conceito que norteia esta tecnologia é o de que a atenuação do fóton *in vivo* é uma função da composição de cada tecido. A medição da composição corporal pelo DXA assume que o corpo consiste em três componentes, que são distinguíveis por suas propriedades de atenuação do raio-X: gordura, osso e tecido livre de gordura. O exame é realizado com o corpo supinado, dividindo o corpo em séries de *pixels* e, dentro de cada um destes, a atenuação do fóton é mensurada em duas diferentes energias⁵³. O DXA, portanto, permite a estimação da composição corporal, a partir de medidas da atenuação da radiação do raio-X *pixel-por-pixel* sobre toda a superfície corporal⁵⁴.

Dentro de qualquer *pixel*, as proporções de dois componentes podem ser separadas pela diferente absorção de duas energias de fóton. Tecidos moles, formados em grande parte por água e compostos orgânicos, reduzem o fluxo de fóton quando comparados ao osso. *Pixels* contendo osso são, de forma relativa, facilmente distinguidos daqueles sem a presença de osso. Em áreas onde o osso não está presente, a calibração adequada permite que frações gordas e magras sejam distinguidas⁵³.

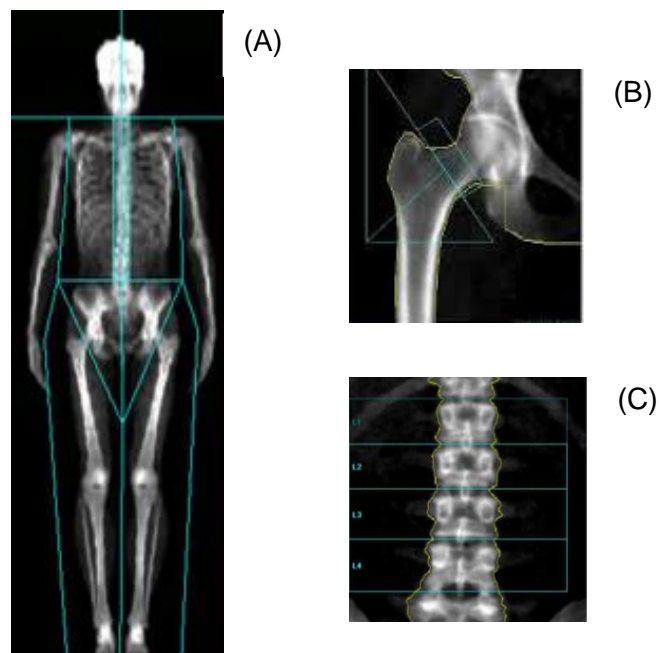


Figura 4: Exemplo de imagens obtidas pelo DXA: (A) Corpo inteiro; (B) Colo do fêmur; (C) Coluna lombar.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Fatores associados à massa mineral óssea

Vários fatores são descritos como potenciais determinantes da massa óssea. Podem ser agrupados em fatores não modificáveis, como sexo, idade, tamanho do corpo, genética e etnia, e modificáveis, como fatores relacionados ao estilo de vida, incluindo níveis de atividade física, tabagismo, padrões de consumo de álcool e alimentação¹⁴.

A hereditariedade é responsável por aproximadamente 70% da variância da massa óssea⁵⁵. Logo na primeira infância, já se observa uma variação na DMO de crianças que pode ser explicada pela herança genética, no sentido de que uma maior DMO dos pais refletirá na maior DMO de seus filhos⁵⁶. Esta mesma relação pode ser observada em outras fases da vida^{57, 58}, inclusive na fase de perda óssea⁵⁸. Juntamente aos fatores genéticos, encontram-se outros determinantes distais da massa mineral óssea, como características demográficas e socioeconômicas. Com relação a sexo e cor da pele, a literatura é consistente ao demonstrar que indivíduos do sexo feminino^{59, 60 61, 62} e de cor da pele branca^{63, 64} apresentam valores inferiores de CMO e DMO em todas as fases da vida, quando comparado àqueles do sexo masculino e de cor da pele preta. Já a pior condição socioeconômica da família parece estar negativamente associada com a DMO da criança, pelo fato da mesma não alcançar o comprimento/altura esperado, quando comparado àquelas mais ricas⁶⁵.

Durante o período gestacional, alguns fatores também podem interferir na programação da massa óssea do feto^{66, 67}. Espera-se que, em condições normais, o feto acumule durante o período intrauterino, aproximadamente 30 gramas de cálcio, com a maior parte deste acúmulo ocorrendo no último trimestre da gravidez⁶⁶, no entanto, em condições uterinas adversas, pode ocorrer uma limitação do crescimento e do ganho de peso, interferindo na posterior trajetória de desenvolvimento esquelético⁶⁸. Fatores como aporte adequado de macronutrientes, vitaminas e minerais no decorrer da gravidez^{69, 70}, adequado estado nutricional pré-gestacional⁶⁹ e crescimento fetal ideal⁷¹, assim como exposição solar, principalmente no último trimestre⁷², apresentam associação positiva com CMO e DMO na infância e adolescência.

Em contrapartida, o fumo materno reduz valores de massa mineral óssea observados logo no nascimento e, ainda, no decorrer da adolescência^{73, 74}. Do mesmo modo, a duração da gestação também pode ter influência negativa. Crianças consideradas pré-termo, nascidas antes de 37 semanas de gestação, têm valores menores de CMO e DMO do que crianças nascidas com idade gestacional adequada^{75, 76}.

O peso e o comprimento ao nascer também são fortes determinantes da massa óssea, com grande corpo de evidências confirmando a associação positiva de ambas variáveis com maior CMO e DMO do nascimento à vida adulta^{68, 69, 71, 77-80}.

Dando seqüência a lógica do ciclo vital, aspectos da infância também precisam ser relatados. Evidências ainda não são claras sobre o efeito da amamentação na massa óssea, pois os achados dos estudos ainda são controversos^{69, 78, 81}. Já o crescimento adequado nessa fase de vida tem sido associado com a massa mineral óssea^{82, 83}, onde baixas taxas de crescimento durante a infância têm efeito negativo estendido até idades avançadas, sendo considerado importante preditor de fraturas no quadril⁸⁰.

Em relação à composição corporal e estado nutricional na infância, a adiposidade pode ser prejudicial para o desenvolvimento de parâmetros de resistência óssea e acumulação de massa óssea durante o crescimento⁸⁴. Estudos demonstraram que crianças que sofreram fraturas no antebraço eram mais propensas a terem excesso de peso e CMO reduzido ou menor tamanho de osso^{85, 86}. Além disso, tem-se comprovado que o aumento do peso corporal, índice de massa corporal (IMC) e massa gorda aumentam, de forma independente, o risco de sofrer fratura^{85, 87}. No mesmo sentido, distúrbios do comportamento alimentar como anorexia nervosa e bulimia estão associados à severos e frequentemente irreversíveis déficits na DMO⁸⁸, com redução da massa óssea ocorrendo mesmo após uma duração curta da doença⁸⁹.

Certos determinantes podem de alguma forma alterar a massa mineral óssea em mais de um momento do ciclo vital, como é o caso de medicamentos, doenças endócrinas, atividade física e alimentação. Medicamentos, incluindo anti-convulsivos e agentes quimioterapêuticos, bem como condições endócrinas associadas à glicocorticóides ou paratormônio (PTH) em excesso, hipogonadismo, hipertiroidismo ou deficiência do hormônio do crescimento ou de

fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) estão associados com baixa massa óssea¹⁵.

Já a prática de atividade física favorece a formação e manutenção da massa óssea em todas as fases da vida⁹⁰⁻⁹⁷, enquanto que a nutrição também favorece esses mesmos aspectos. De forma oposta, a nutrição inadequada pode causar prejuízos à massa óssea, visto que muitos nutrientes ou componentes alimentares estão diretamente envolvidos no metabolismo ósseo. Dependendo do nutriente e/ou alimento, os efeitos sobre a absorção intestinal e a excreção urinária de cálcio podem ser positivos (como cálcio e vitamina D) ou negativos (como cafeína, álcool e gorduras)⁹⁸. Um subitem específico sobre os efeitos da alimentação sobre a massa óssea será descrito posteriormente, devido à relevância para o presente projeto de pesquisa.

Especificamente na adolescência, durante a fase da maturação sexual, em torno de um quarto da massa óssea adulta é acumulada⁴², geralmente ocorrendo mais cedo nas meninas, coincidindo com a idade da menarca⁹⁹.

O tabagismo é consistentemente reconhecido como um fator de risco para fraturas e menor DMO, porque a nicotina inibe a produção de osteoblastos, responsáveis pela síntese de componentes orgânicos na matriz óssea¹⁰⁰. O consumo de álcool em excesso também se mostra prejudicial para a saúde do esqueleto^{51, 101}. Já sobre a influência do estado nutricional e a composição corporal, no final da adolescência e durante a vida adulta, evidências ainda não são claras; o que se observa é que adultos obesos apresentam valores mais elevados de DMO do que indivíduos magros⁹⁹. No entanto, uma possível explicação para isso é porque a massa gorda exerce forças mecânicas sobre o tecido ósseo, acarretando maior osteogênese. Porém, se o obeso é sedentário, como ocorre em inúmeras condições clínicas associadas à obesidade, a força e massa musculares reduzidas podem levar à osteopenia¹⁰². Quanto à massa magra, resultados apontam efeito positivo da massa magra sobre a saúde óssea são menos controversos¹⁰³⁻¹⁰⁵.

Por fim alguns dos fatores associados à formação, manutenção e perda da massa óssea afetam exclusivamente as mulheres, devido aos processos reprodutivos. Existem 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^{77, 106-108}, enquanto outros não encontraram associação¹⁰⁹. Ainda, informações sobre a magnitude da perda óssea durante a gravidez ainda não são tão claras, já a perda óssea associada à lactação pode chegar até 9%¹¹⁰.

2.2 Fatores dietéticos e massa óssea

Muitos dos nutrientes e componentes alimentares que consumimos como parte da alimentação diária pode, potencialmente, ter um impacto positivo ou negativo sobre a saúde óssea¹⁴. Esses podem influenciar os ossos por meio de vários mecanismos, incluindo alteração da estrutura óssea, da taxa de metabolismo ósseo, do sistema endócrino e/ou parácrino, da homeostase do cálcio e, possivelmente, de outros elementos minerais ósseo-ativos¹¹¹. Os fatores dietéticos variam de minerais inorgânicos (como, cálcio, fósforo e sódio) e vitaminas, a substâncias, como cafeína e álcool e macronutrientes, tais como proteínas. Além disso, as proporções relativas destes fatores alimentares derivados de diferentes tipos de dietas (como dieta vegetariana e omnívora) podem também afetar a saúde dos ossos¹⁴.

O corpo humano adulto contém cerca de 1.000 a 1.500 g de cálcio (dependendo de sexo, raça e tamanho do corpo), onde 99% encontram-se localizado nos ossos¹¹². O cálcio proveniente da dieta é necessário para a acumulação óssea, e sua ingestão durante a infância e adolescência afeta tanto a aquisição de massa óssea quanto o risco de fraturas osteoporóticas na vida adulta¹⁵. O fósforo é o segundo elemento em maior abundância no corpo humano, com 85% dele ligado ao esqueleto. Embora seja um nutriente essencial, há preocupação de que quantidades excessivas podem ser prejudiciais ao osso, principalmente por causar o aumento da reabsorção óssea¹¹². Neste sentido, uma baixa razão cálcio/fosfato, caracterizado pela baixa ingestão de cálcio e alta ingestão simultânea de fosfato também pode representar um efeito negativo na saúde do osso, aumentando a reabsorção e diminuindo a formação óssea¹¹³.

Já a ingestão excessiva de sódio e proteína causa aumento da excreção urinária de cálcio^{114, 115}. Em média, para cada 100 mmol (2.300 mg) de sódio excretados na urina, há cerca de 0,6 a 1 mmol (24-40 mg) de perda de cálcio¹¹⁶. E, para cada incremento de 50 g de proteína ingerida, um adicional de 60 mg de cálcio urinário é excretado¹¹⁷. Além disso, o consumo excessivo de cafeína e álcool também pode causar efeitos deletérios à saúde óssea¹⁴, por aumentar a

excreção de cálcio através da urina^{118, 119} ou inibir a remodelação óssea, respectivamente¹²⁰.

Em relação às vitaminas, a principal ação da vitamina D é manter a homeostase de cálcio. Sem a presença desta vitamina, apenas 10% a 15% do cálcio dietético é absorvido¹²¹. Já a vitamina K, atua indiretamente na mineralização¹²², enquanto que a vitamina A é importante no processo de remodelação óssea¹¹².

Observa-se que grande parte das investigações epidemiológicas relacionadas a aspectos nutricionais envolvidos na saúde óssea é focada em abordagens relativas a nutrientes, como cálcio, fósforo ou vitamina D¹²³⁻¹²⁵, alimentos isolados, ou grupo de alimentos, como frutas, vegetais e produtos lácteos^{18, 126, 127}. No entanto, devido às limitações conceituais e metodológicas dessas abordagens, como o confundimento pela ingestão concomitante de outros alimentos e nutrientes, o exame dos efeitos conjuntos dos vários componentes da dieta recentemente ganhou grande interesse^{128, 129}. Desta forma, a análise de padrões alimentares tem sido utilizada para elucidar possíveis associações entre padrões dietéticos típicos e desfechos de saúde. Este tipo de análise avalia tendências gerais dos sujeitos em consumir mais frequentemente certos tipos de alimentos e refeições, ao invés de um único alimento ou nutriente¹³⁰. Neste sentido, a adesão a padrões dietéticos “saudáveis”, caracterizados pelo consumo de peixes, azeite de oliva, frutas e vegetais e baixo consumo de carne vermelha e doces tem sido positivamente associados com DMO em diferentes populações¹³¹⁻¹³³. Inversamente, padrões ocidentais de alimentação, ricos em gorduras e óleos, carnes e carnes processadas, apresentam associação negativa¹³².

Outra possível alternativa para avaliar este tipo de associação é a abordagem epidemiológica de RM, que usa variantes genéticas como variáveis instrumentais robustamente associadas com exposições modificáveis de interesse para inferir a relação causal entre a exposição e desfechos em saúde clinicamente relevantes^{22, 24, 134}. A abordagem deste delineamento baseia-se nos princípios da 1ª e 2ª Leis de Mendel, que preveem a aleatoriedade da transmissão de variantes genéticas na ausência de casamentos preferenciais na população e a independência entre as variantes transmitidas^{135, 136}.

A RM é um experimento natural análogo aos ensaios clínicos randomizados por intenção de tratar, diferenciando-se deste pelo fato de a aleatorização dos indivíduos nos grupos ser dada pelos genótipos (variáveis de exposição). Como as variantes genéticas são segregadas de forma aleatória e independente, é assumido que diferenças entre os grupos sejam resultantes unicamente do genótipo, e não de fatores de confusão. A abordagem também apresenta outras vantagens, como o fato de as associações não serem diluídas por erros de medida, uma vez que as técnicas de biologia molecular permitem a identificação dos genótipos com alta precisão. Ainda, a abordagem tem a capacidade de avaliar o efeito cumulativo de uma exposição, pois o genótipo de um indivíduo é determinado na fecundação dos gametas e não muda com o passar do tempo. Esta última é, possivelmente, a maior vantagem deste tipo de estudo, ou seja, a ausência de causalidade reversa, levando ao aumento do potencial de inferência causal de estudos transversais²².

Neste sentido, dentro da epidemiologia genética, a hipolactasia (ou intolerância à lactose) é uma condição que vem recebendo relativa atenção, principalmente sua relação com doenças ligadas ao consumo de leite, mais especificamente com a redução no seu consumo e consequente carência de cálcio¹³⁷. A hipolactasia está relacionada com a incapacidade de digerir a lactose, um dissacarídeo comum no leite e em seus derivados e, conseqüentemente, pode resultar em sintomas relacionados com dores e desconfortos abdominais, flatulência e diarreia¹³⁸. O que caracteriza a doença é a perda de expressão da enzima lactase nos enterócitos do intestino delgado¹³⁹.

A partir de 2002, identificou-se SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), fortemente associados com a hipolactasia em adultos por afetarem a produção da enzima lactase¹⁴⁰. O principal é o -13910C>T (rs4988235), cuja presença do alelo T corresponde perfeitamente com o genótipo de persistência da lactase (PL) em populações europeias. Indivíduos adultos heterozigotos são, portanto, considerados lactase persistentes por apresentarem atividade enzimática suficiente para hidrolisar a lactose provinda da dieta^{140, 141}. A intolerância à lactose (ou não persistência da lactase - NPL) na vida adulta se manifesta através de homozigose para o alelo C, o que leva a má digestão da lactose^{140, 141}. Indivíduos com fenótipo PL mostram uma produção da enzima lactase ininterrupta através de toda a sua vida, e são capazes de consumir maiores

quantidades de lactose, e conseqüentemente, quantidades mais elevadas de leite e produtos lácteos, sem sintomas de intolerância à lactose em comparação com indivíduos NPL^{141, 142}.

2.3 Modelo conceitual de determinação hierárquica

A partir do exposto anteriormente foi estabelecido um modelo conceitual teórico para expor os fatores determinantes da massa óssea na adolescência e início da vida adulta, o qual está apresentado na Figura 5.

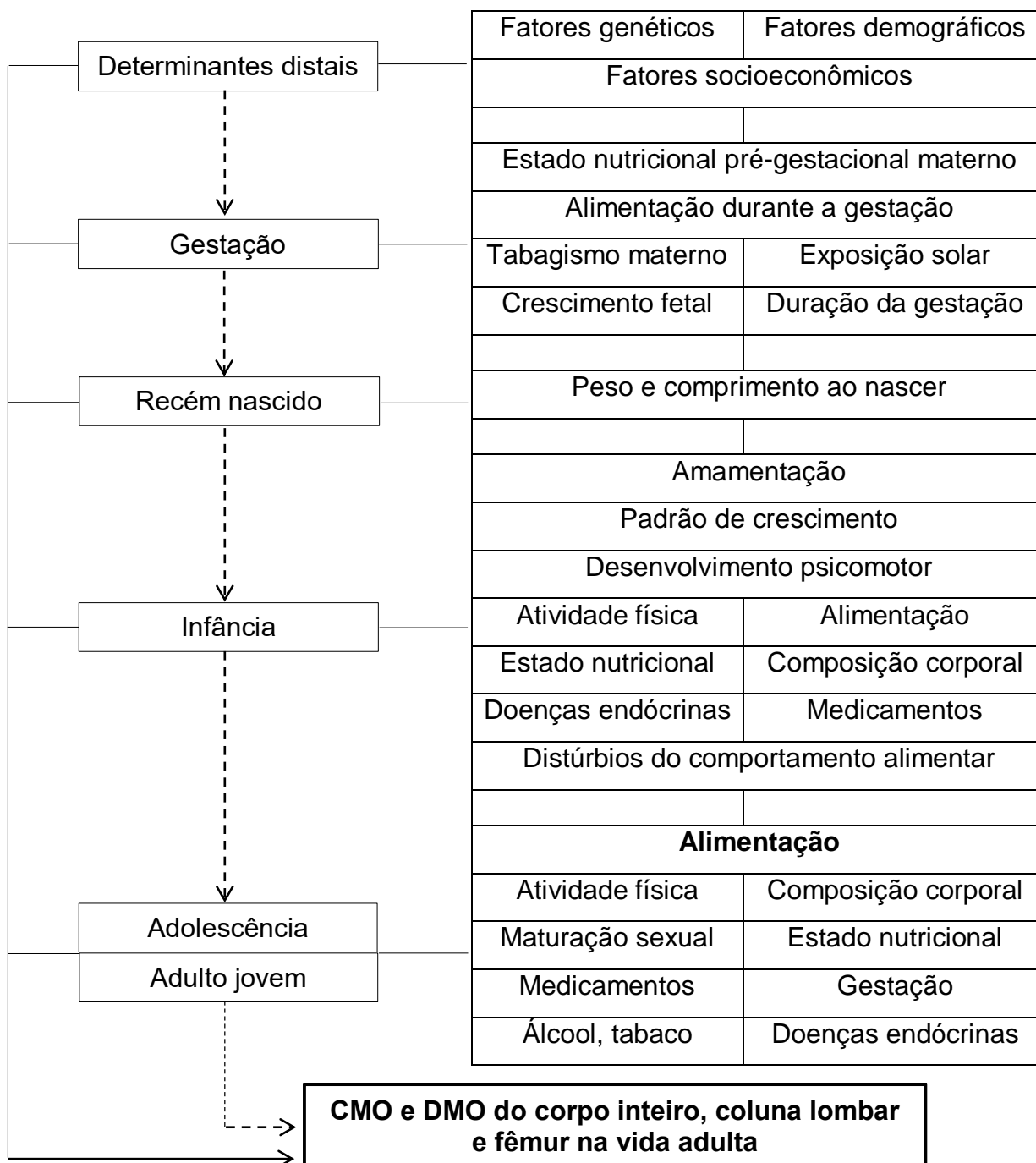


Figura 5: Modelo conceitual de determinação hierárquica de CMO e DMO na vida adulta. Os níveis superiores determinam aqueles inferiores, seja passando por toda a cadeia (através de setas tracejadas), ou de forma indireta, através das setas cheias.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Com a finalidade de identificar estudos que avaliaram a relação entre determinantes dietéticos e saúde óssea, realizou-se uma revisão de literatura na base de dados MEDLINE (*Pubmed*), utilizando diversas combinações de descritores do *Medical Subject Headings* (MeSH) para as exposições e desfechos (Quadro 1). A busca limitou-se a estudos realizados em seres humanos, publicados em inglês, espanhol e português.

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

Com base nos artigos identificados, uma análise inicial foi conduzida, através da leitura dos títulos obtidos na busca, com seleção daqueles que abordavam a associação de interesse, sendo as referências recuperadas e importadas para um software específico (EndNote X4, Thompson Reuters Inc.). Em seguida, realizou-se a análise dos resumos e, na sequência, a leitura na íntegra dos artigos considerados relevantes. Após esta etapa, a lista de referências dos artigos selecionados foi também verificada, para averiguar se havia algum estudo de interesse ainda não incluído na revisão. O resultado final de todo o processo de revisão encontra-se resumido no Quadro 1.

Os 18 artigos selecionados para comporem a revisão de literatura deste projeto de pesquisa estão resumidos do Quadro 2, sendo descritos de acordo com as diferentes exposições de interesse abordadas.

Quadro 1: Descritores utilizados, estratégia de busca e síntese do número de artigos recuperados nas bases de dados.

Descritores	Termos de busca			
Massa óssea	1	"bone density" OR "bone mineral density" OR "bone mineral content"		
DXA	2	"absorptiometry, photon"		
Grupo etário	3	"adolescent" OR "young adult" OR "adult"		
Alimentação	4	"diet" OR "eating" OR "feeding behavior" OR "food habits" OR "diet, food, and nutrition"		
Base de dados	Estratégia de Busca* = 1 + 2 + 3 + 4			
	Localizados	Títulos selecionados	Resumos selecionados	Artigos de interesse
<i>Pubmed</i>	623	154	34	18**
<i>Lilacs</i>	51	13	0	0
<i>Web of Science</i>	21	8	0	0
Total	695	175	34	18

*Combinação dos termos para busca.

**Motivos das exclusões: 6 estudos avaliaram alimentação e saúde óssea em populações muito específicas (ciclistas, tenistas e ginastas); 2 avaliaram participantes com alimentação específica (macrobiótica); 2 avaliaram como exposição valores séricos de cálcio, fosfato e vitamina D; 4 avaliaram saúde óssea a partir de outros métodos como absorciometria por fóton único ou duplo; 1 não avaliou o efeito isolado da alimentação na saúde óssea, apenas sua interação com atividade física; 1 definiu padrões alimentares previamente ao estudo e verificou a associação entre a aderência a esses padrões e saúde óssea.

Quadro 2: Principais estudos que avaliaram a associação entre determinantes dietéticos na adolescência e saúde óssea na vida adulta.

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
Exposição dietética: PADRÕES ALIMENTARES					
<p>Portugal</p> <p>Monjardino et al. (2015)¹⁴³</p>	<p>Quantificar as potenciais associações entre padrões alimentares definidos a posteriori no início da adolescência e DMO do antebraço</p> <p>N = 1.007 adolescentes de ambos os sexos</p> <p>Coorte</p>	<p><u>Alimentação:</u> Quatro padrões alimentares a partir de QFA aplicado aos 13 anos: “Saudável”, “Produtos lácteos”, “Fast food e doces” e “baixo consumo”</p>	<p><u>FC:</u> IMC, consumo energético total, educação dos pais, prática de atividade física e idade da menarca (apenas para as meninas)</p>	<p><u>Massa Óssea:</u></p> <p>- DMO do antebraço (g/cm^2) não dominante (13 anos de idade)</p> <p>- Variação anual de DMO ($\text{mg/cm}^2/\text{ano}^{-1}$) do antebraço entre 13 e 17 anos (17 anos de idade)</p>	<p>A média da DMO aos 13 e aos 17 anos não apresentou alteração de acordo com os padrões alimentares identificados ($p > 0,005$).</p> <p>Coefficientes de regressão linear brutos e ajustados não mostram associação entre os padrões alimentares identificados e DMO aos 13 anos.</p> <p>Já aos 17 anos, entre as meninas, associação inversa estatisticamente significativa foi encontrada entre o padrão “baixo consumo” e variação de DMO anual entre 13 e 17 anos após ajuste [$\beta = -0,451$]</p>

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
					(IC95%: -0,827; -0,074) mg/cm ² /ano ⁻¹].
Coréia do Sul Shin et al. (2013) ¹⁴⁴	Identificar os principais padrões alimentares e suas associações com DMO entre adolescentes coreanos N = 196 adolescentes de ambos os sexos Transversal	<u>Alimentação:</u> Quatro padrões alimentares a partir de recordatório alimentar de seis dias: “Tradicional Coreano”; “Fast Food”, “Leite e Cereais” e “Snacks”	<u>FC:</u> Idade, sexo, percentil de IMC, tentativas de perda de peso, status puberal, atividade física	<u>Massa Óssea:</u> DMO da coluna lombar (L1-L4) e fêmur (g/cm ²) (12-15 anos de idade)	Após ajuste, adolescentes do maior tercil do padrão de “Leite e Cereais” apresentaram uma chance menor de ter baixa DMO em comparação com aqueles do menor tercil para a coluna lombar (OR: 0,36; IC95%: 0,14-0,93; p=0,0461).
Exposição dietética: ALIMENTOS					
China Li et al. (2013) ¹²⁷	Analisar a associação entre consumo de frutas e vegetais e massa óssea em adolescentes, mulheres pós-parto e mulheres na pós-menopausa	<u>Alimentação:</u> Ingestão de frutas e vegetais (gramas/dia) a partir de QFA, analisado em tercios	<u>FC:</u> idade, IMC em escore-z, ingestão dietética de energia em escore-z, proteína e cálcio, atividade física em escore-z, uso de suplementos vitamínicos, o uso de suplementos de	<u>Massa Óssea:</u> DMO (g/cm ²) e CMO (g) do corpo inteiro, coluna lombar (L1-L4) e quadril esquerdo (incluindo quadril total e colo do fêmur)	Para os adolescentes, DMO em escore-z aumentou 0,30 (ou 2,6% da média), 0,25 (3,9%), 0,27 (3,5%) e 0,29 (4,0%), e CMO em escore-z aumentou 0,44 (7,6%),

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
	<p>N por grupos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 222 adolescentes de ambos os sexos (11-14 anos), - 371 mulheres jovens no pós parto (20-34 anos), - 333 mulheres em pós menopausa (50-70 anos) <p>Transversal</p>		cálcio, sexo e estágio de Tanner (para adolescentes) e anos de menopausa (para pós menopausadas)	(11-14 anos de idade)	<p>0,31 (7,2%), 0,44 (7,5%) e 0,36 (5,9%) do corpo inteiro, coluna lombar, quadril total e colo do fêmur em participantes pertencentes ao tercil superior em comparação com o tercil inferior do consumo de frutas (todos $p < 0,01$), respectivamente.</p> <p>Após ajuste, análise de regressão mostrou que a DMO em score-z entre os meninos foi superior entre aqueles de maior ingestão</p> <p>diária de frutas e vegetais combinadas (gramas) para os sítios do quadril, trocânter, diáfise femural e área de Ward ($\beta = 0,195$; $0,190$; $0,222$ e $0,197$; respectivamente; $p < 0,05$).</p>

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
<p>Coréia do Sul</p> <p>Song et al. (2008)¹⁴⁵</p>	<p>Investigar o efeito da ingestão de soja e isoflavona na DMO e na sua mudança ao longo de dois anos em jovens mulheres coreanas</p> <p>N = 34 mulheres jovens saudáveis</p> <p>Coorte</p>	<p><u>Alimentação:</u> Ingestão de soja e isoflavona de soja a partir de pelo menos 8 recordatórios de 24 horas aplicados a cada 4 meses</p>	<p><u>FC:</u> idade, menarca, IMC atual, e DMO na linha de base</p>	<p><u>Massa Óssea:</u> percentual de mudança da DMO (g/cm²) da coluna lombar (L2-L4) e de três sítios do quadril: colo do fêmur (FN), triângulo de Ward (WT) e trocânter femoral (FT) ao longo de dois anos (20-26 anos de idade)</p>	<p>O percentual de variação da DMO em dois anos de acompanhamento foi de 2,5% para a coluna lombar, 1,6% para a FN, 5,2% para WT, e -2,2% para FT. A mudança na DMO ao longo dos dois anos foi diferente da linha de base para a coluna lombar (<i>linha de base: 1,121 g/cm²; IC95%: 0,942-1,479; após dois anos: 1,149 g/cm²; IC95%: 0,950-1,579; p=0,04</i>) e para WT (<i>linha de base: 0,891 g/cm²; IC95%: 0,587-1,212; após dois anos: 0,936 g/cm²; IC95%: 0,643-1,272; p=0,0001</i>). Observou-se uma relação positiva entre a porcentagem média diária de energia de soja e mudança da DMO em dois anos para FN (<i>r=0,33, p=0,05</i>) e WT (<i>r=0,51,</i></p>

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
					<p>$p=0,002$). Associações semelhantes com a ingestão de isoflavona foram evidenciadas com FN ($r=0,34$, $p=0,05$) e WT ($r=0,51$, $p=0,002$).</p> <p>Ainda, para cada aumento de 1 mg de isoflavona, a DMO aumentou significativamente a uma taxa de 0,26% ($p=0,05$) ao ano para FN e 0,31% ($p=0,008$) ao ano para WT.</p>
<p>Irlanda McGartland et al. (2004)¹⁸</p>	<p>Determinar se a ingestão habitual de frutas e vegetais relatada pelos adolescentes tem influência sobre a DMO</p> <p>N = 1.345 adolescentes de ambos os sexos</p>	<p><u>Alimentação:</u> Ingestão de frutas e vegetais (gramas/dia) a partir de método de história alimentar de um mês, analisado em tercís</p>	<p><u>FC:</u></p> <p>- Ajuste 1: altura e peso atuais estágio puberal, atividade física, classe social, consumo de álcool, tabagismo e uso de suplemento</p> <p>- Ajuste 2: ajuste adicional para potássio, magnésio, cálcio,</p>	<p><u>Massa Óssea:</u> DMO (g/cm²) do antebraço não dominante (rádio distal) e calcânhar dominante (calcâneo) (12 e 15 anos de idade)</p>	<p>Após a classificação dos participantes de acordo com o tercil de ingestão, na análise bruta, meninas de 12 anos de idade com uma alta ingestão de frutas tinham significativamente maior DMO do calcânhar do que aquelas com consumo de frutas moderado ($\beta=0,024$; $p<0,05$), e as meninas de</p>

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
	Transversal		vitamina D, vitamina C, fibras e caroteno		15 anos de idade com uma alta ingestão de frutas tinham significativamente maior DMO do calcanhar do que aquelas com uma baixa ingestão ($\beta=0,023$; $p<0,05$). Após ajuste 1, a associação positiva entre a ingestão elevada de frutas e DMO do calcanhar nas meninas de 12 anos de idade foi reforçada ($\beta=0,028$; $p<0,05$). Após o ajuste 2, a associação entre a alta ingestão de frutas e DMO do calcanhar aos 12 anos aumentou ainda mais ($\beta=0,037$; $p<0,05$). Não foram observadas associações entre a ingestão de frutas e DMO do antebraço ou entre ingestão de vegetais e DMO do antebraço ou calcanhar.

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
<p>Estados Unidos</p> <p>Kalkwarf et al. (2003)¹⁴⁶</p>	<p>Determinar se a ingestão de leite durante a infância e adolescência, quando controlados para a ingestão de cálcio atual, está associada com a massa óssea adulta, densidade mineral óssea e incidência de fraturas osteoporóticas</p> <p>N = 1.371 mulheres com 20 anos ou mais de idade posteriormente classificadas em dois grupos: de 20-49 anos e 50 anos ou mais</p> <p>Transversal</p>	<p><u>Alimentação:</u> Ingestão de leite na infância (5-12 anos) e adolescência (13-17 anos) a partir de recordatório de 24 horas</p>	<p><u>FC:</u></p> <p>- Para DMO e CMO: ingestão atual de cálcio, idade, peso e altura atuais (apenas para CMO), deficiência de estrogênio e atividade física</p> <p>- Para área óssea: peso, idade e ingestão atual de cálcio na dieta</p>	<p><u>Massa Óssea:</u> DMO (g/cm²), CMO (g) e área óssea (cm²) do quadril esquerdo</p> <p>(20-49 e 50 ou mais anos de idade)</p>	<p>Para aquelas de 20 a 49 anos, as médias de CMO e DMO para aquelas que consumiram <1 porção de leite/semana foram aproximadamente 3% inferiores aos das mulheres que consumiram >1 porção de leite/dia durante a adolescência ($p<0,02$).</p> <p>A área óssea não apresentou alteração de acordo com as diferentes quantidades de ingestão de leite durante a adolescência ($p=0,13$).</p>
Exposição dietética: ALIMENTOS E NUTRIENTES					

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
China Foo et al. (2007) ¹⁴⁷	Examinar se existe associação entre a composição corporal, força muscular de preensão manual, ingestão alimentar e exercício físico com o CMO e área óssea (AO) N = 283 adolescentes do sexo feminino Transversal	<u>Alimentação:</u> Ingestão de leite, cálcio, vitamina D e fosfato alimentar a partir de recordatório alimentar de três dias	<u>FC:</u> composição corporal, força muscular de preensão manual, fase da puberdade, ingestão alimentar e atividade física	<u>Massa Óssea:</u> CMO (g) e AO (g) do corpo inteiro, e do antebraço distal e proximal (15 anos de idade)	Após ajuste, a ingestão de leite se tornou um preditor independente para CMO do corpo inteiro ($\beta=0,265$; $p<0,0001$), juntamente com massa magra, área óssea e massa gorda, representando 77% da variância.
Exposição dietética: NUTRIENTES					
Canadá Tereszkowski et al. (2012) ¹²⁵	Investigar a DMO em mulheres jovens canadenses, bem como determinar quais os fatores de estilo de vida são significativamente relacionados com a	<u>Alimentação:</u> Ingestão de cálcio e vitamina D a partir de QFA	<u>FC:</u> sem análise ajustada	<u>Massa Óssea:</u> DMO do colo do fêmur esquerdo, coluna lombar (L1-L4) e corpo inteiro (20-33 anos de idade)	Correlação estatisticamente significativa apenas entre DMO do corpo inteiro e vitamina D proveniente da dieta ($r=0,369$; $p\leq 0,05$).

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
	<p>DMO nessa mesma população</p> <p>N = 31 mulheres jovens</p> <p>Transversal</p>				
<p>Japão</p> <p>Ito et al. (2011)¹²⁴</p>	<p>Examinar a influência do consumo de fosfato e cálcio e da relação de ingestão de Ca/P na DMO em jovens mulheres japonesas cuja relação de ingestão de Ca/P foi assumida como sendo menor do que a de jovens mulheres ocidentais</p>	<p><u>Alimentação:</u> Ingestão de cálcio e fosfato a partir de questionário de história alimentar auto aplicado</p>	<p><u>FC:</u> idade pós-menarca, IMC atual e duração da atividade física</p>	<p><u>Massa Óssea:</u> DMO do terço distal do rádio do antebraço não dominante, coluna lombar (L2-L4) e colo do fêmur não dominante (18-22 anos de idade)</p>	<p>Maior ingestão de Ca e uma relação de ingestão de Ca/P superior foram significativamente associadas com maior DMO na extremidade distal do rádio ($\beta=0,08$; $p<0,05$; $\beta=48,11$; $p<0,05$; respectivamente), mas não com DMO da coluna lombar e colo do fêmur.</p>

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
	<p>N = 441 mulheres jovens</p> <p>Transversal</p>				
<p>Canadá Bedford et al. (2011)¹⁴⁸</p>	<p>Relatar a relação transversal entre sódio urinário de 24h e excreção urinária de cálcio, e examinar se a associação difere entre aqueles com alta e baixa ingestão de cálcio. Associações com DMO e com mudança de DMO em 2 anos também foram avaliados</p> <p>N = 102 mulheres saudáveis</p>	<p><u>Alimentação:</u> Ingestão de cálcio a partir de QFA</p>	<p><u>FC:</u> sem análise ajustada</p>	<p><u>Massa Óssea:</u> DMO do corpo inteiro, coluna lombar (L1-L4) e quadril (g/cm²) (19-35 anos de idade)</p>	<p>Os participantes foram classificados em baixa (≤ 506 mg/1000 kcal) e alta (> 506 mg/1000 kcal) ingestão de cálcio de acordo com a mediana. Não foram observadas diferenças na média de DMO do corpo inteiro ($p=0,272$), coluna lombar ($p=0,384$) e quadril ($p=0,170$) de acordo com os grupos de ingestão de cálcio.</p>

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
	Transversal				
Estados Unidos Beasley et al. (2010) ¹⁴⁹	Examinar associações transversais e longitudinais entre ingestão de proteína na linha de base e DMO entre 560 mulheres com idades entre 14-40 anos N = 560 mulheres Coorte	<u>Alimentação:</u> Ingestão de proteína animal e vegetal a partir de QFA	<u>FC:</u> idade, IMC atual, atividade física, tabagismo, exposição recente ao acetato de medroxiprogesterona de depósito, consumo de energia, fósforo e magnésio	<u>Massa Óssea:</u> - Análise transversal: média de DMO do corpo inteiro, quadril e coluna lombar (g/cm ²) - Análise longitudinal: mudança absoluta de DMO do corpo inteiro, quadril e coluna lombar (g/cm ²) em três anos de acompanhamento (14-40 anos de idade)	<u>Análise transversal:</u> na linha de base, a média de DMO foi similar em cada tercil de ingestão de proteína. As mulheres do menor tercil de ingestão de proteína vegetal tiveram menor DMO do que aquelas que consumiram mais proteína vegetal (<i>maior tercil: 0,94 g/m²; IC95%: 0,92; 0,96 vs. menor tercil: 0,92 g/m² IC95%: 0,90; 0,94; p=0,03; para o quadril; maior tercil: 1,08 g/m²; IC95%: 1,06; 1,09 vs. menor tercil: 1,07 g/m²; IC95%: 1,06; 1,09; p=0,04 para o corpo inteiro</i>). <u>Análise longitudinal:</u>

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
					Para cada percentual de aumento no percentual de energia a partir de proteína, não houve alterações longitudinais significativas na DMO em qualquer sítio anatômico, em qualquer ponto de tempo. O tipo de ingestão de proteína (animal/vegetal) também não foi associado com a mudança na DMO.
<p>Canadá</p> <p>Carter et al. (2001)¹²⁶</p>	<p>Examinar a relação entre ingestão de cálcio autorrelatada e CMO em crianças e adolescentes</p> <p>N = 227 crianças e adolescentes</p> <p>Transversal</p>	<p><u>Alimentação:</u> Ingestão de cálcio a partir de dois a quatro recordatórios de 24 horas</p>	<p><u>FC:</u> peso e altura atuais e área óssea do corpo inteiro (para CMO do corpo) ou área óssea da coluna lombar (para CMO da coluna lombar)</p>	<p><u>Massa Óssea:</u> CMO do corpo inteiro e da coluna lombar (L1-L4) (g), bem como a área óssea nestes locais (cm²)</p> <p>(8-17 anos de idade)</p>	<p>A ingestão de cálcio foi maior no sexo masculino (<i>M</i>: 1284 ± 549 mg, <i>F</i>: 902 ± 372 mg; <i>p</i><0,001), assim como o CMO do corpo inteiro (<i>M</i>: 1793 ± 602g; <i>F</i>: 1581 ± 513g; <i>p</i>=0,005); área óssea total do corpo (<i>M</i>: 1845 ± 405 cm²; <i>F</i>: 1694 ± 373 cm²; <i>p</i>=0,004) e área óssea da coluna lombar (<i>M</i>: 53 ± 10cm²; <i>F</i>: 49 ± 9; <i>p</i>=0,001). Não</p>

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
					<p>foram observadas correlações entre ingestão de cálcio e CMO do corpo inteiro e da coluna lombar. Nos modelos finais de regressão linear múltiplos para CMO do corpo inteiro e coluna lombar, a ingestão de cálcio associou-se apenas para CMO da coluna entre os meninos ($\beta=0,06$; $p=0,01$), após a inclusão da variável de cálcio no modelo de regressão ajustado para área óssea da coluna e peso, representando um aumento de 0,4% (93,4% vs. 93,0%) na variabilidade explicada.</p>
<p>Itália Maggiolini et al. (1999)¹²³</p>	<p>Avaliar o efeito da ingestão de cálcio, idade, status da menarca, massa corporal e atividade</p>	<p><u>Alimentação:</u> Ingestão de cálcio a partir de recordatório alimentar de três dias</p>	<p><u>FC:</u> sem análise ajustada</p>	<p><u>Massa Óssea:</u> DMO (mg/cm²) do rádio ultra distal e proximal do braço não dominante</p>	<p>As meninas foram divididas em dois grupos: 100 com menor ingestão de cálcio e 100 com maior ingestão de cálcio. O mesmo foi feito</p>

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
	<p>física na DMO do antebraço de 200 meninas e 100 mulheres jovens vivendo no sul da Itália</p> <p>N = 200 meninas (11-15 anos) e 100 mulheres (20-23 anos)</p> <p>Transversal</p>			(11-15 e 20-23 anos de idade)	<p>para as mulheres, identificando 50 delas para cada grupo. Em ambos os subgrupos, apesar da ingestão de cálcio diferir, os valores de DMO ultra distal e proximal do rádio não apresentaram diferenças significativas.</p>
<p>Suécia Lotborn et al. (1999)¹⁵⁰</p>	<p>Examinar a influência do tamanho corporal, desenvolvimento puberal, nível de atividade física, gasto energético total, ingestão de energia, cálcio e vitamina D, e álcool e hábitos de fumo</p>	<p><u>Alimentação</u>: cálcio e vitamina D a partir de registro alimentar de sete dias com pesagem dos alimentos</p>	<p><u>FC</u>: sem análise ajustada</p>	<p><u>Massa Óssea</u>: CMO total (g), DMO total (g/cm²) e área óssea (cm²) (15 anos de idade)</p>	<p>Observou-se correlação positiva entre os meninos para cálcio e área óssea ($r=0,34$; $p=0,0001$), CMO total ($r=0,33$; $p=0,0001$) e DMO total ($r=0,26$; $p=0,0006$); para vitamina D e área óssea ($r=0,35$; $p=0,0001$), CMO total</p>

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
	<p>no CMO total e DMO total</p> <p>N = 396 adolescentes</p> <p>Transversal</p>				<p>($r=0,35$; $p=0,0001$) e DMO total ($r=0,28$; $p=0,0003$) e para ingestão de energia e área óssea ($r=0,26$; $p=0,0007$), CMO total ($r=0,27$; $p=0,0003$) e DMO total ($r=0,22$; $p=0,0044$).</p>
<p>Estados Unidos</p> <p>Lloyd et al. (1998)¹⁵¹</p>	<p>Determinar se a cafeína da dieta consumida por mulheres americanas brancas entre 12 a 18 anos afeta o ganho mineral ósseo total durante as idades de 12 a 18 anos ou afeta a densidade óssea do quadril medida aos 18 anos</p> <p>N = 81 adolescentes</p>	<p><u>Alimentação:</u> Média de ingestão de cafeína em seis anos de acompanhamento a partir de registro alimentar de três dias</p>	<p><u>FC:</u> sem análise ajustada</p>	<p><u>Massa Óssea:</u> ganho ósseo total (g) dos 12 aos 18 anos, CMO total (g) aos 12 e aos 18 anos e DMO do quadril (g/cm²) aos 18 anos</p>	<p>Os indivíduos foram divididos em três grupos de ingestão de cafeína [menos do que um refrigerante por dia (Grupo I), 1-2 refrigerantes por dia (Grupo II), mais de 2 refrigerantes por dia (Grupo III)]. Não foram observadas diferenças nos desfechos de acordo com os grupos de ingestão.</p>

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
	Coorte				
Estados Unidos Wang et al. (1997) ¹⁵²	<p>Examinar de forma transversal: (1) diferenças raciais/étnicas na massa óssea e comprimento do eixo do quadril, e (2) a relação de massa óssea e comprimento do eixo do quadril com altura, peso, ingestão de cálcio e proteína, e atividade de sustentação de peso</p> <p>N = 423 pessoas de ambos os sexos</p> <p>Transversal</p>	<p><u>Alimentação:</u> Ingestão de cálcio e proteína a partir de questionário de história alimentar</p>	<p><u>FC:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - CMO: etnia (asiáticos, pretos, hispânicos), peso atual, altura atual, área óssea, ingestão de cálcio, proteína e energia, e atividade física - DMO e DMO aparente: asiáticos, pretos, hispânicos, peso, altura, cálcio, proteína, energia e atividade física 	<p><u>Massa Óssea:</u> CMO (g), DMO (g/cm²) e DMO aparente (g/cm³) do corpo inteiro, coluna lombar (L2-L4), quadril esquerdo (colo do fêmur)</p> <p>(9-25 anos de idade)</p>	<p>Os participantes foram classificados de acordo com sua maturação sexual em: puberdade precoce (estágios de Tanner 1 e 2), meados da puberdade (estágios de Tanner 3 e 4) e maturidade (estágio de Tanner 5). Após análise de regressão linear múltipla, entre as meninas em puberdade precoce, cálcio e proteína associaram-se com DMO aparente do colo do fêmur ($\beta=0,005 \pm 0,002$; $p<0,01$; $\beta=-0,001 \pm 0,0005$; $p<0,01$; <i>respectivamente</i>). Entre os meninos, em meados da puberdade, cálcio associou-se com CMO do corpo inteiro ($\beta=-8,05 \pm 3,51$; $p<0,05$) e com DMO do corpo inteiro ($\beta=-$</p>

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
					<p>$0,01 \pm 0,002$; $p < 0,01$). Já entre aqueles no grupo de maturidade, a proteína associou-se com DMO do corpo inteiro ($\beta = 0,002 \pm 0,001$; $p < 0,05$) e com DMO aparente da coluna lombar ($\beta = 0,0005 \pm 0,0002$; $p < 0,05$).</p>
<p>Austrália Henderson et al. (1995)¹⁵³</p>	<p>Avaliar as inter-relações de potenciais determinantes do pico de densidade óssea e densidade mineral óssea em uma variedade de locais do esqueleto axial e apendicular em um grupo homogêneo de mulheres jovens saudáveis</p>	<p><u>Alimentação</u>: Ingestão de cálcio, fosfato, proteína e energia total a partir de registro alimentar de quatro dias com pesagem dos alimentos</p>	<p><u>FC</u>: sem análise ajustada</p>	<p><u>Massa Óssea</u>: CMO (g) e DMO (g/cm²) da coluna lombar, fêmur proximal (colo do fêmur, trocânter, intertrocânter e quadril total) e diáfise femural (18 anos de idade)</p>	<p>A ingestão de cálcio (mg/dia) foi positivamente correlacionada com DMO do trocânter ($r = 0,19$; $p \leq 0,05$); o fosfato (mg/dia) com DMO do colo do fêmur ($r = 0,21$; $p \leq 0,05$), trocânter ($r = 0,24$; $p < 0,005$) e quadril total ($r = 0,19$; $p \leq 0,05$); e a ingestão de proteína (g/dia) associou-se com DMO do colo do fêmur ($r = 0,22$; $p \leq 0,05$), trocânter ($r = 0,27$; $p < 0,005$), intertrocânter ($r = 0,19$; $p \leq 0,05$) e quadril total ($r = 0,21$; $p \leq 0,05$).</p>

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
	<p>N = 115 mulheres saudáveis</p> <p>Transversal</p>				
<p>Estados Unidos</p> <p>Recker et al. (1992)¹⁵⁴</p>	<p>Testar se a massa óssea aumenta em mulheres brancas saudáveis e não grávidas durante a vida adulta após a cessação do crescimento linear; e testar se vários níveis de atividade física e ingestão de nutrientes ou o uso de contraceptivos orais influenciam este aumento da massa óssea</p>	<p><u>Alimentação:</u> Ingestão de cálcio e proteína a partir de diário alimentar de sete dias a cada seis meses durante cinco anos de acompanhamento</p>	<p><u>FC:</u> sem análise ajustada</p>	<p><u>Massa Óssea:</u> CMO (g/cm) e DMO (g/cm²) do antebraço e da coluna lombar a cada seis meses e CMO (g) do corpo inteiro duas vezes durante cinco anos de acompanhamento (~21 anos de idade)</p>	<p>Os sítios do antebraço e coluna lombar e a medida do corpo inteiro demonstraram aumento na massa óssea ao longo do período de estudo. As medianas de mudança por década foi de 4,8% na DMO e CMO do antebraço, de 5,9% para CMO e 6,8% para DMO da coluna lombar e de 12,5% de ganho para CMO do corpo inteiro (<i>todos com p<0.0001</i>). Na análise bivariada entre fatores de</p>

País Autor, ano	Objetivo Amostra Delineamento	Exposição	Fatores de confusão (FC)	Desfecho Idade no desfecho	Principais resultados
	N = 156 mulheres saudáveis Coorte				vida modificáveis e DMO da coluna lombar, apenas a razão cálcio/proteína apresentou correlação positiva ($r=0,19$; $p=0,017$).

3.1 Características dos artigos incluídos na revisão

Os 18 artigos selecionados foram publicados entre os anos de 1992 e 2015, sendo cinco estudos de coorte^{143, 145, 149, 151, 154} e 13 estudos transversais^{18, 123-127, 144, 146-148, 150, 152, 153}.

As amostras variaram de 31¹²⁵ a 1.371 indivíduos¹⁴⁶. Com exceção de dois artigos publicados na China, os demais foram realizados em países de renda alta, como Estados Unidos, Canadá e Coréia do Sul.

Quanto ao tipo de exposição, dois estudos utilizaram padrões alimentares, quatro avaliaram o consumo de alimentos específicos, como frutas, vegetais, soja e leite, onze avaliaram o consumo de nutrientes (como cálcio, fosfato, proteína e vitamina D) e somente um avaliou conjuntamente o consumo de alimentos e nutrientes (leite, cálcio, vitamina D e fosfato). Quanto ao método de avaliação do consumo, a maioria aplicou métodos retrospectivos, como o questionário de frequência alimentar (QFA) (n=5), recordatório de 24 horas (R24h) (n=6), questionário de história alimentar (n=3). Os métodos prospectivos aplicados foram o diário alimentar (n=1) e registro alimentar (n=3), sendo que dentre estes últimos, dois realizaram pesagem dos alimentos.

Com relação às medidas de massa óssea, todos os estudos fizeram esta avaliação utilizando DXA. Nove artigos avaliaram apenas DMO, um avaliou apenas CMO, cinco avaliaram DMO e CMO, dois avaliaram DMO, CMO e área óssea e um CMO e área óssea. Apenas três artigos avaliaram DMO, CMO ou área óssea de um único sítio anatômico, sendo eles braço, antebraço e quadril, enquanto que, a maioria, analisou dois ou mais sítios, sendo os mais comumente estudados coluna lombar e fêmur, além da análise do corpo inteiro.

A respeito das análises estatísticas entre exposições e desfechos, cinco realizaram análise de regressão linear, nove aplicaram testes de correlação ou diferença entre médias, um aplicou correlação e regressão linear, outro aplicou diferença entre médias e regressão linear, outro regressão logística e correlação e por fim, um avaliou regressão linear, correlação e diferença entre médias. Quanto aos ajustes nas análises, onze artigos realizaram análises ajustadas para fatores de confusão. As variáveis de confusão utilizadas nos ajustes foram sexo, idade, etnia, peso e altura atuais ou IMC, composição corporal, força de preensão manual, nível econômico, educação dos pais, consumo energético total, ingestão de álcool, tabagismo, idade da menarca, status puberal, prática

de atividade física, história de dieta para perder peso, uso de suplementos vitamínicos e de cálcio, consumo de vitaminas e alguns minerais. Análises longitudinais também ajustaram para massa óssea na linha de base. Nenhum artigo realizou análise de mediação.

3.2 Efeito dos determinantes dietéticos na saúde óssea

3.2.1 Determinantes dietéticos abordados na forma de padrões alimentares

Os dois artigos que avaliaram padrões alimentares foram publicados recentemente e investigaram a DMO de sítios anatômicos específicos (antebraço, coluna lombar e fêmur), sendo um transversal e outro de coorte. O estudo transversal encontrou um efeito de proteção para aqueles indivíduos no maior tercil de adesão ao padrão “leite e cereais”, caracterizado pelo consumo de leite e iogurte, cereais e pão¹⁴⁴. O estudo de coorte encontrou uma associação negativa, para as meninas, entre o padrão “baixo consumo” identificado aos 13 anos e a variação anual de DMO do antebraço entre 13 e 17 anos. Esse padrão foi caracterizado, especialmente, pelo baixo consumo de carne vermelha, peixe, frutas, massas/batata/arroz, produtos lácteos, cereais e gorduras¹⁴³.

3.2.2 Determinantes dietéticos abordados na forma de alimentos

3.2.2.1 Frutas e vegetais

Dois estudos abordaram como exposição o consumo de frutas e vegetais, encontrando associações conflitantes. Li e colaboradores (2013), em uma análise transversal, observaram que o consumo combinado de frutas e verduras entre os meninos pertencentes ao maior tercil de ingestão diária foi associado com maior DMO nos sítios do quadril, trocânter, diáfise femural e área de Ward, comparados àqueles situados no menor tercil¹²⁷. Uma associação positiva também foi observada em um estudo transversal conduzido por McGartland e colaboradores (2004). No entanto, esta se deu apenas para as meninas e especificamente para o consumo de frutas, ao comparar aquelas pertencentes

ao maior tercil com aquelas do tercil moderado de ingestão diária, em relação à DMO do calcânhar¹⁸.

3.2.2.2. Soja e isoflavonas

Um único estudo de coorte observou, em dois anos de acompanhamento, um aumento de 2,5% na DMO da coluna lombar, 1,6% na DMO do colo do fêmur, 5,2% na DMO do triângulo de Ward e uma redução de 2,2% para a DMO do trocânter femural, associado ao consumo de soja e isoflavonas de soja em mulheres de 20 a 26 anos de idade (média de 22,1 ± 1,2 anos)¹⁴⁵.

3.2.2.3. Leite

Mulheres que durante a adolescência (entre 13 e 17 anos) tiveram um consumo maior de leite apresentaram, na vida adulta, um aumento de 3% no CMO e DMO do quadril, comparado àquelas com menor consumo¹⁴⁶.

3.2.3 Determinantes dietéticos abordados na forma de alimentos e nutrientes

O único estudo transversal que avaliou o efeito conjunto de alimentos e nutrientes (leite, cálcio, vitamina D e fosfato), encontrou associação positiva apenas entre CMO do corpo inteiro e o consumo de leite, sendo esse um preditor independente que, juntamente com massa magra, área óssea e massa gorda, explicaram 77% da variância para CMO do corpo inteiro¹⁴⁷.

3.2.4 Determinantes dietéticos abordados na forma de nutrientes

Os artigos que avaliaram apenas nutrientes foram desmembrados de forma que pudessem ser encaixados nos subitens que seguem:

3.2.4.1 Cálcio

Do total de 11 artigos que avaliou o consumo de nutrientes específicos, nove deles avaliaram a ingestão de cálcio. Destes, quatro estudaram a relação entre ingestão de cálcio (três de forma transversal e um longitudinalmente) e saúde óssea, mais especificamente: DMO do colo do fêmur esquerdo, coluna lombar e corpo inteiro¹²⁵; DMO do corpo inteiro, coluna lombar e quadril¹⁴⁸; DMO

do rádio ultra distal e proximal do braço¹²³; CMO, DMO e DMO aparente (densidade óssea volumétrica, medida a partir de g/cm³) do corpo inteiro, coluna lombar, quadril esquerdo¹⁵⁴ e não encontraram associação.

Correlações positivas entre consumo de cálcio e massa óssea foram observadas em dois artigos. Um deles avaliou CMO e DMO da coluna, fêmur e diáfise femural e encontrou correlação positiva apenas com DMO do trocânter¹⁵³, ao passo que outro, encontrou correlação positiva com todos os desfechos em estudo: área óssea, CMO total e DMO total, apenas entre aqueles do sexo masculino¹⁵⁰.

Os demais três artigos avaliaram associação, de forma transversal, através de regressão linear. Um avaliou DMO do terço distal do rádio do antebraço não dominante, coluna lombar e colo do fêmur não dominante, evidenciando que uma maior ingestão de cálcio, foi significativamente associada com maior DMO na extremidade distal do rádio¹²⁴. Outro estudo, dentre os desfechos avaliados (CMO do corpo inteiro e coluna lombar e área óssea nestes locais), encontrou associação positiva apenas com o CMO da coluna entre os meninos, onde o acréscimo da variável de ingestão de cálcio no modelo de regressão ajustado para área óssea da coluna e peso, aumentou em 0,4% na variabilidade explicada¹²⁶. Ainda, um estudo que avaliou CMO, DMO e DMO aparente do corpo, coluna lombar e quadril esquerdo, entre crianças e adolescentes de 9 a 25 anos, classificados de acordo com sua maturação sexual, encontrou entre as meninas classificadas em puberdade precoce, associação negativa com DMO aparente do colo do fêmur. Para os participantes classificados no grupo de “meados da puberdade”, a ingestão de cálcio associou-se negativamente, entre os meninos, com o CMO do corpo inteiro e DMO do corpo inteiro¹⁵².

3.2.4.2 Fosfato

Um estudo que avaliou CMO e DMO da coluna, fêmur e diáfise femural, encontrou associação positiva entre a ingestão de fosfato com DMO do colo do fêmur, trocânter e quadril total¹⁵³.

3.2.4.3 Relação cálcio/fosfato

Foi encontrada uma associação entre uma maior relação cálcio/fósforo com maior DMO da extremidade distal do rádio em um estudo que também avaliou coluna lombar e colo do fêmur não dominante, a partir de uma análise transversal¹²⁴.

3.2.4.4 Proteína

Quatro artigos avaliaram a ingestão de proteína e sua relação com a saúde óssea. Destes um, com delineamento de coorte, não encontrou associação¹⁵⁴. Entre os demais, o estudo de Henderson e colaboradores (1995) que avaliou transversalmente CMO e DMO da coluna, fêmur e diáfise femural, encontrou correlação positiva entre a ingestão proteína (g/dia) e DMO do colo do fêmur, trocânter, intertrocânter e quadril total¹⁵³. Outro estudo transversal, que avaliou CMO, DMO e DMO aparente do corpo (avaliado em g/cm³), avaliado a partir da coluna lombar e quadril esquerdo, entre crianças e adolescentes de 9 a 25 anos classificados de acordo com sua maturação sexual, encontrou, entre as meninas, que a ingestão de proteína associou-se com maior DMO aparente do colo do fêmur. Este mesmo estudo, ao classificar os participantes de acordo com sua maturação sexual, encontrou que para aqueles classificados no grupo de maturidade, a proteína associou-se positivamente com DMO do corpo inteiro e com DMO aparente da coluna lombar¹⁵².

Ainda, um estudo avaliou transversalmente a ingestão de proteína animal e vegetal e DMO do corpo inteiro, quadril e coluna lombar e, longitudinalmente, a mudança da DMO nesses sítios num período de três anos de acompanhamento. O principal resultado encontrado foi que mulheres do menor tercil de ingestão de proteína do tipo vegetal tiveram menor DMO do quadril e do corpo inteiro quando comparadas àquelas do tercil superior. Na análise longitudinal, não foram observadas alterações na DMO dos sítios analisados durante o período de estudo¹⁴⁹.

3.2.4.5 Relação cálcio/proteína

A relação cálcio/proteína também foi estudada por um artigo, cujo objetivo foi acompanhar mulheres saudáveis durante cinco anos, avaliando sua relação com CMO e DMO do antebraço e da coluna lombar e CMO do corpo inteiro.

Verificou-se associação positiva entre esta relação apenas com DMO da coluna lombar¹⁵⁴.

3.2.4.6 Vitamina D

A ingestão de vitamina D foi avaliada em dois estudos e correlacionou-se positivamente com os desfechos em ambos. Observou-se correlação positiva, entre os meninos, para área óssea, CMO total e DMO total¹⁵⁰ e apenas com a DMO do corpo inteiro para o estudo que também avaliou a DMO do colo do fêmur esquerdo e coluna lombar¹²⁵.

3.2.4.7 Cafeína

O artigo que avaliou o ganho de CMO total em seis anos e DMO do quadril ao final do acompanhamento, de acordo com ingestão de cafeína, não observou diferença nos desfechos de acordo com as categorias de ingestão¹⁵¹.

3.3 Síntese dos resultados

Os achados desta revisão demonstram que a maior parte das investigações avaliou fatores dietéticos na forma de alimentos ou nutrientes, o que dificulta a real compreensão destas exposições sobre a massa óssea do indivíduo, tendo em vista que a ingestão concomitante de outros alimentos também pode interferir no desfecho. Apesar de poucos estudos terem avaliado padrões alimentares, os mesmos apresentam limitações, principalmente pelo fato de que um único padrão pode incluir alimentos saudáveis e não saudáveis e, no caso da massa óssea, pode incluir alimentos com efeito benéfico e com efeito prejudicial à saúde óssea. Os padrões alimentares não são excludentes, ou seja, é possível um mesmo indivíduo aderir a mais de um padrão. Ainda, a comparação e extrapolação dos resultados utilizando padrões alimentares também é limitada, pois os mesmos são específicos para a população estudada¹⁵⁵.

O sítio ósseo avaliado nos estudos também apresentou ampla variabilidade, o que limita a comparação entre os mesmos.

Outro fato a ser considerado diz respeito aos ajustes realizados, que podem não ter contemplado toda a gama de fatores que podem confundir a associação entre alimentação e massa mineral óssea. Ainda, alguns estudos

realizaram análise de correlação, que não se mostra apropriada para avaliar associação, pois não fornece uma medida de efeito, apenas relata o quanto a relação entre as variáveis é linear.

Os estudos sobre o tema são escassos em países de baixa e média renda, como o Brasil, limitando a inferência dos achados para essas populações.

Apesar destas considerações é possível concluir, com cautela, que os fatores dietéticos relacionados à melhor saúde óssea são decorrentes do consumo adequado de proteínas, vitamina D, cálcio, leite, bem como da adesão a padrões alimentares com presença de leite e cereais.

3.4 Persistência da lactase e massa óssea

Além da revisão de literatura com objetivo de recuperar estudos baseados na associação entre determinantes dietéticos e massa óssea, optou-se por realizar uma revisão sobre estudos de RM cujo desfecho tenha sido massa óssea e que tenham utilizado o SNP rs4988235 como variável instrumental, pelo fato de ser um potencial marcador genético do consumo de leite e derivados e estar disponível na coorte de nascimentos de 1982.

Foi possível constatar que os estudos envolvendo o SNP em questão e massa óssea foram estudos que apenas investigaram a associação entre essas variáveis, não envolvendo análises de RM. A maioria dos artigos avaliou como desfecho DMO¹⁵⁶⁻¹⁵⁹, pico de massa óssea¹⁶⁰, perda de massa óssea¹⁶¹, osteoporose¹⁶², fraturas^{156, 158, 163}.

Estudos com diferentes populações encontraram associação deste SNP com o consumo de produtos lácteos^{157, 164}. Sendo assim, considerando que a literatura aponta uma relação entre consumo de leite e massa óssea com efeito positivo na mineralização óssea em diferentes fases da vida¹⁶⁵⁻¹⁶⁸, a utilização de SNPs como indicadores genéticos (variáveis instrumentais) do consumo de laticínios, através de uma análise de RM, permitiria avaliar o efeito do consumo de produtos lácteos sobre a massa óssea, sem a presença de fatores de confusão.

4. JUSTIFICATIVA

A adolescência é o período mais sensível para o incremento das reservas ósseas e para a redução de futuras perdas, fato este que justifica o maior interesse acerca da avaliação dinâmica e acurada do tecido ósseo durante este período¹⁶⁹. Desta forma, acredita-se que, ao se potencializar o acúmulo de massa óssea, na tentativa de atingir seu pico ideal durante a adolescência ou ao final da maturação esquelética, além de sua manutenção na fase adulta, podem-se minimizar as reduções com o avançar da idade, contribuindo, assim, com a prevenção de quadros osteoporóticos e futuras fraturas subsequentes^{37, 170, 171}.

Neste sentido, ações direcionadas aos fatores de risco modificáveis durante a adolescência, principalmente aqueles relacionados a hábitos de vida, como a alimentação, que podem predispor a uma baixa massa óssea durante esta janela crítica para acúmulo de osso, bem como a compreensão do papel dos componentes dietéticos no metabolismo ósseo, poderiam dar subsídios à formulação de ações de prevenção²⁰.

A coorte de 1993 possui dados sobre alimentação coletados a partir de questionário de frequência alimentar (QFA) aplicado aos 15, 18 e 22 anos de idade e avaliação da massa óssea realizada a partir de método padrão-ouro aos 22 anos, permitindo avaliar o papel dos determinantes dietéticos, tanto na forma de nutrientes, quanto de alimentos ou padrões alimentares no decorrer destes três acompanhamentos, sobre a massa óssea no início da vida adulta, aos 22 anos.

Já a coorte de 1982, possui dados genéticos provindos de varredura genômica conduzida no DNA coletado aos 22 anos, assim como dados de massa óssea e de consumo de leite e derivados coletados no acompanhamento dos 30 anos. Ainda, subsidiando a utilização de análise genética no presente projeto de pesquisa, estudo prévio realizado nesta coorte encontrou associação positiva entre o SNP e o consumo de produtos lácteos¹⁶⁴.

Com base nisso, o presente trabalho se propõe a contribuir na produção de conhecimento, através da investigação do efeito de fatores dietéticos na saúde óssea no início da vida adulta.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Estudar a associação entre fatores dietéticos e massa óssea nas coortes de nascimentos de 1982 e 1993 da cidade de Pelotas/RS.

5.2 Objetivos Específicos

- Investigar, a partir de revisão da literatura, a relação entre determinantes dietéticos e massa óssea na adolescência e vida adulta;
- Descrever a massa óssea (CMO e DMO do corpo inteiro, coluna lombar e colo do fêmur) aos 22 anos de idade, estratificada por sexo, segundo variáveis demográficas e socioeconômicas, dos pertencentes à coorte de nascimentos de 1993;
- Avaliar o efeito de fatores dietéticos – nutrientes, alimentos e padrões alimentares – aos 15, 18 e 22 anos, sobre a massa óssea aos 22 anos de idade, estratificado por sexo, na coorte de nascimentos de 1993;
- Avaliar o efeito do consumo de leite e derivados sobre a massa óssea aos 30 anos através da abordagem de randomização mendeliana, utilizando o polimorfismo rs4988235 como variável instrumental, na coorte de nascimentos de 1982.

6. HIPÓTESES

Maiores valores de CMO e DMO aos 22 anos de idade serão observados em jovens:

- ✓ Do sexo masculino;
- ✓ De cor da pele não branca;
- ✓ Com maiores níveis de atividade física;
- ✓ Não tabagistas.

Jovens com maior adesão a padrões alimentares ricos em alimentos facilitadores da absorção de cálcio aos 15, 18 e 22 anos terão maior CMO e DMO aos 22 anos de idade na coorte de nascimentos de 1993;

O consumo de leite, determinado geneticamente, estará positivamente associado à DMO e CMO dos sítios avaliados.

7. METODOLOGIA

7.1 Delineamento

Estudo longitudinal prospectivo desenvolvido com dados das coortes de nascimentos de 1982 e 1993 da cidade de Pelotas/RS. Essas coortes de nascimento são estudos de base populacional que recrutaram, nos respectivos anos, todos os nascimentos hospitalares de mulheres que residiam na zona urbana de Pelotas, e acompanharam, em diferentes momentos, os indivíduos que integravam o estudo. O último acompanhamento da coorte de 1982 ocorreu junho de 2012 a fevereiro de 2013, quando os participantes tinham, em média, 30 anos de idade e o da coorte de 1993, de outubro de 2015 a agosto de 2016, quando os jovens tinham, em média, 22 anos de idade.

7.2 Metodologia das Coortes de Nascimentos de Pelotas/RS

7.2.1 Coorte de Nascimentos de 1982

A coorte de nascidos vivos de Pelotas do ano de 1982 corresponde ao primeiro estudo de acompanhamento iniciado na cidade. No estudo iniciado em 1982, todas as mães que tiveram partos hospitalares ocorridos em Pelotas entre os dias 1º de janeiro e 31 de dezembro do corrido ano, moradoras da zona urbana do município, foram visitadas pela equipe de pesquisa. No respectivo ano ocorreram nos hospitais 6.011 nascimentos de moradores da zona urbana do município, o que correspondeu a 99,2% do total de nascimentos ocorridos na cidade, sendo que, 5.914 nascidos vivos fizeram parte do acompanhamento perinatal.

A partir da linha de base, outros acompanhamentos foram realizados, nas idades da infância, adolescência e idade adulta que possibilitaram diferentes estudos sobre a saúde destes indivíduos. A Tabela 1, a seguir, mostra os principais acompanhamentos executados, até hoje, pela coorte de 1982.

Detalhes sobre os acompanhamentos são encontrados em publicação metodológica específica¹⁷²⁻¹⁷⁵.

Tabela 1: Informações de alguns acompanhamentos dos nascidos vivos na cidade de Pelotas em 1982.

Ano	Descrição da população alvo	Idade média	Elegíveis	Entrevistados	Perdas (%)
1982	Todos os nascidos vivos nos hospitais de Pelotas em 1982	Nascimento	5.914	5.914	-
1983	Todos nascidos entre janeiro e abril de 1982	11,3 meses	1.916	1.457	20,7
1984	Todas as crianças	19,4 meses	5.914	4.934	12,8
1986	Todas as crianças	43,1 meses	5.914	4.742	15,9
1995	20% de toda a coorte	13,1 anos	1.100	715	30,1
1997	27% de toda a coorte	14,7 anos	1.597	1.076	28,2
2000	Todos do sexo masculino	18,2 anos	3.037	2.250	21,1
2001	27% de toda a coorte	18,9 anos	1.597	1.031	31,0
2004-5	Todos os jovens	22,8 anos	5.914	4.297	22,6
2012-13	Todos os jovens	30,2 anos	5.914	3.701	31,9

Fonte: adaptada de Barros et al., 2008¹⁷³

7.2.2 Coorte de Nascimentos de 1993

No estudo de coorte de 1993, todos os partos hospitalares ocorridos na zona urbana de Pelotas entre os dias 1º de janeiro a 31 de dezembro de 1993 foram visitados por um integrante da pesquisa. Além disso, 42 mulheres tiveram seus filhos em casa e posteriormente foram levadas para o hospital. O número total de partos, nesse ano, foi 6.410.

A linha de base do estudo foi composta por 5.320 crianças, sendo que sete mães não foram encontradas e nove recusaram-se a participar da pesquisa, proporcionando uma taxa de perdas e recusas perinatais de 0,3%. Dentre as 5.304 mães entrevistadas, em 55 dos casos o feto foi retirado da mãe sem vida, portanto a população final da coorte de 1993 foi composta por 5.249 crianças nascidas vivas, filhos de mães residentes na zona urbana da cidade de Pelotas/RS que foram localizadas nos hospitais e que aceitaram participar do estudo.

A partir da linha de base, outros acompanhamentos foram realizados com a amostra total e com subamostras. A Figura 6, a seguir, mostra os principais acompanhamentos executados, até hoje, pela coorte de 1993.

Detalhes sobre os acompanhamentos são encontrados em publicação metodológica específica^{176, 177}.

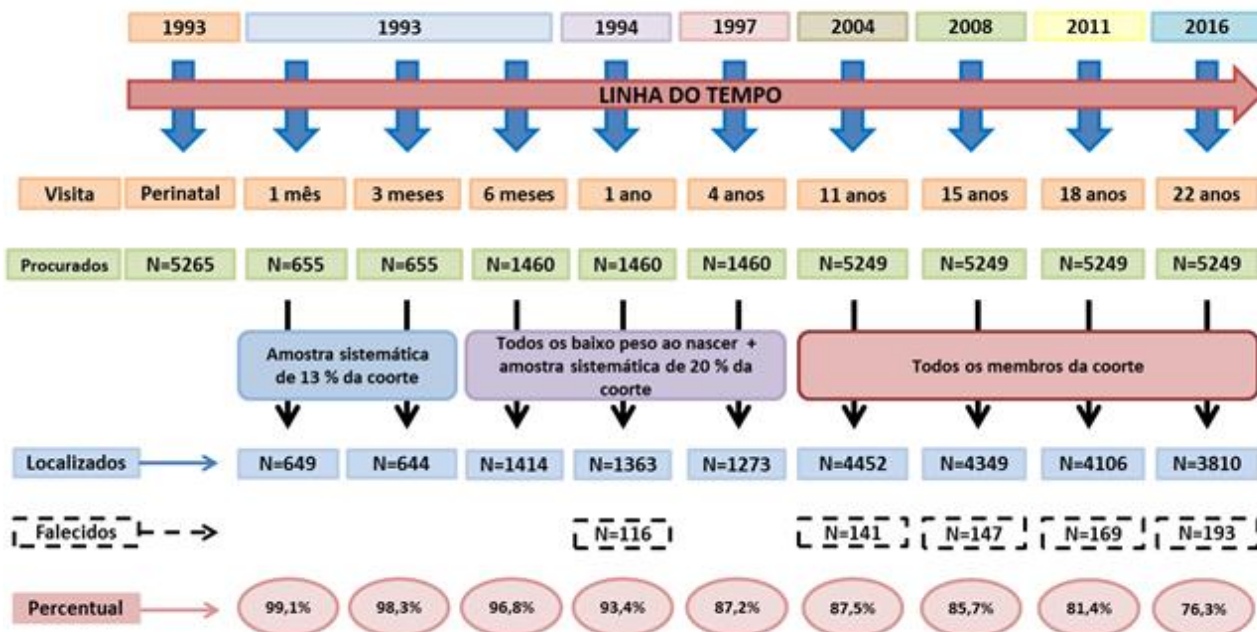


Figura 6: Resumo dos acompanhamentos da coorte de nascimentos de 1993, Pelotas, RS.

7.3 População em estudo

7.3.1 Coorte de Nascimentos de 1982

Todos os 5.914 nascidos vivos em 1982 residentes na zona urbana do município de Pelotas.

7.3.2 Coorte de Nascimentos de 1993

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

7.4 Critérios de inclusão

7.4.1 Coorte de Nascimentos de 1982

Serão incluídos no estudo os participantes que foram acompanhados aos 22 e 30 anos com informação genética, sobre consumo de produtos lácteos e massa mineral óssea.

7.4.2 Coorte de Nascimentos de 1993

Serão incluídos no estudo os participantes que foram acompanhados aos 15, 18 e 22 anos com informação sobre consumo alimentar e massa mineral óssea.

7.5 Critérios de exclusão

Serão excluídos do estudo os participantes com as seguintes características nos acompanhamentos dos 30 anos da coorte de 1982, e, dos 18 e 22 da coorte de 1993:

- Com próteses metálicas fixas em qualquer parte do corpo (exceto aparelho ortodôntico);
- Com impedimento de realizar o exame com DXA devido à dimensão corporal (acima de 120 quilos o participante não realizava o exame e acima de 1,92 metros realizava apenas coluna lombar e fêmur);
- Com limitações motoras permanentes;
- Que estavam em tratamento com suplemento de cálcio nas últimas 24 horas;
- Jovens grávidas ou com suspeita de gravidez.

7.6 Instrumentos

Todos os instrumentos utilizados nos acompanhamentos das coortes de nascimentos de 1982 e 1993 estão disponíveis no endereço eletrônico <http://www.epidemiologia-ufpel.org.br>.

7.6.1 Instrumento para coleta do desfecho

Em ambas as coortes, para avaliação das medidas de massa mineral óssea foi utilizado o equipamento de DXA da marca Lunar GE. O equipamento é composto por duas partes principais: uma plataforma horizontal, para o participante deitar-se, e um braço móvel, que movimentava a fonte de raio-x no sentido da cabeça para os pés. As medidas foram avaliadas em três sítios: corpo inteiro, coluna lombar e colo do fêmur, sendo obtidas medidas de CMO em gramas e de DMO em gramas por centímetro quadrado a partir do *software* do equipamento.

Durante o exame, os participantes vestiram roupas adequadas (oferecidas pela equipe do estudo), compostas por *top* e bermuda confeccionados em elastano de média compressão.

As avaliações ocorreram conforme procedimentos a seguir:

- Avaliação do corpo inteiro (Figura 7):

- Posicionamento do jovem no centro da mesa, na direção em que está o braço mecânico do DXA (5 cm da linha superior), utilizando a linha central do equipamento como referência;
- De barriga para cima, com as pernas unidas, mãos viradas para o lado com os polegares para cima, palmas direcionadas para as pernas e os braços estendidos ao longo do corpo.
- Uso de faixas de velcro ao nível dos joelhos e tornozelos.

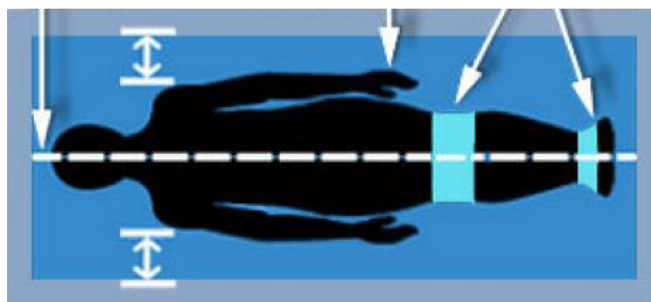


Figura 7: Avaliação da massa mineral óssea do corpo inteiro.

- Avaliação da coluna lombar (Figuras 8 e 9):

- Reposicionamento do braço do aparelho;
- Retirada das fitas de velcro dos joelhos e tornozelos;
- Posicionamento do bloco de espuma sob as pernas (Figura 8) e mãos sobre o peito (Figura 9);
- O feixe de luz incidirá abaixo da cicatriz umbilical (Figura 9) ocorrendo avaliação das vértebras lombares L1 a L4.

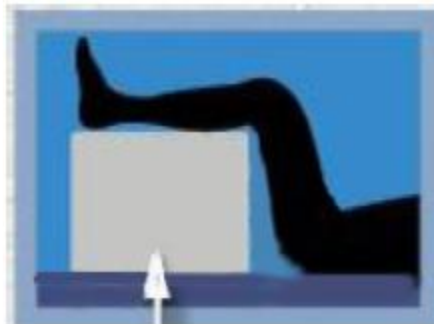


Figura 8: Posicionamento das pernas na avaliação da massa mineral óssea da coluna lombar.

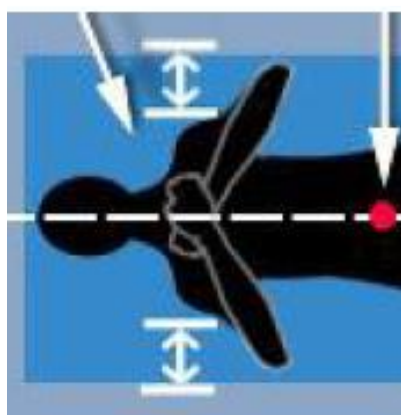


Figura 9: Posicionamento das mãos na avaliação da massa mineral óssea da coluna lombar.

- Avaliação do colo do fêmur (Figura 10):

- Retirada do bloco de espuma e posicionamento do jovem com o aditamento de mensuração do fêmur (Figura 10);
- 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;
- O aparelho irá mensurar automaticamente o fêmur direito após a tomada de medida do fêmur esquerdo.



Figura 10: Posicionamento na avaliação da medida de massa mineral óssea do colo do fêmur.

7.6.2 Instrumentos para coleta das exposições

7.6.2.1 Coorte de Nascimentos de 1982

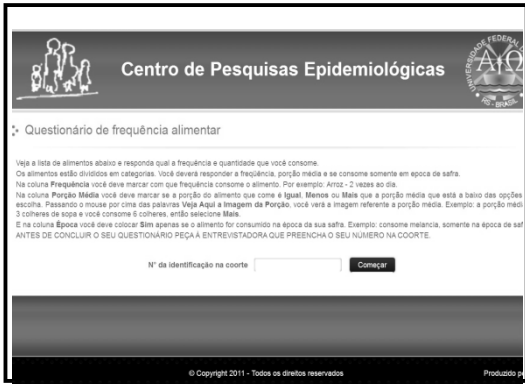
O QFA utilizado no acompanhamento do 30 anos era composto por 88 itens alimentares, dos quais quatro avaliaram o consumo de produtos lácteos (Anexo 1). Este instrumento era do tipo semi-quantitativo, pois investigava a frequência de consumo alimentar e a quantidade consumida nos últimos 12 meses.

Já as amostras de DNA foram genotipadas utilizando a plataforma Illumina HumanOmni2.5-8v1¹⁷⁵. A coorte de nascimentos de 1982 tem dados de aproximadamente 2.5 milhões de SNPs genotipados por esta plataforma, incluindo o SNP rs4988235, que será utilizado como variável instrumental no presente projeto de pesquisa.

7.6.2.2 Coorte de Nascimentos de 1993

O QFA utilizado no acompanhamento dos 15 anos era composto por 81 itens alimentares (Anexo 2) 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 aplicado aos 18 anos era composto por 88 alimentos, sendo idêntico ao aplicado na coorte de 1982 aos 30 anos (Anexo 1), e aos 22 anos era composto por 94 itens alimentares (Anexo 4), ambos do tipo semi-quantitativo, pois investigavam a frequência de consumo alimentar e a quantidade consumida nos últimos 12 meses. Estes questionários foram autoaplicados em formato digital, conforme exemplo de layout observado na Figura 11.

(A)



(B)

9. MORANGO

Frequência

- Nunca ou menos de 1 vez por mês
- 1 a 3 vezes por mês
- 1 vez por semana
- 2 a 4 vezes por semana
- 5 a 6 vezes por semana
- 1 vez por dia
- 2 a 4 vezes por dia
- 5 ou mais vezes por dia

(C)

Época

- Sim
- Não

(D)

Porção Média

- Igual
- Menos
- Mais

• Média
Um Pires

Veja Aqui a Imagem da Porção




Figura 11: Layout do questionário de frequência alimentar digital autoaplicado utilizado no acompanhamento dos 18 anos; (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 porção¹⁷⁸.

7.7 Principais variáveis a serem estudadas

7.7.1 Variáveis dependentes

- DMO avaliada de forma contínua com medida em gramas/centímetros², do corpo inteiro (excluindo a cabeça), coluna lombar e colo do fêmur;
- CMO avaliado de forma contínua com medida em gramas, do corpo inteiro,

coluna lombar e colo do fêmur.

7.8 Coorte de Nascimentos de 1982

7.8.1 Variável independente

Para o artigo original 1, que avaliará o efeito do consumo de leite sobre a massa óssea, os produtos lácteos, cuja ingestão foi obtida através de QFA aos 30 anos, serão utilizados como variáveis independentes (Tabela 2). Para a análise de randomização mendeliana, será utilizado o SNP rs4988235, selecionado com o um potencial *proxy* do consumo de leite devido ao seu papel na persistência da lactase em adultos¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

Tabela 2: Alimentos que serão utilizados como variáveis independentes para a Coorte de 1982 e suas respectivas unidades de medida.

Alimentos	Unidade de Medida
Leite	mililitros por dia (ml/dia)
logurte	mililitros por dia (ml/dia)
Queijo	gramas por dia (g/dia)
Requeijão	gramas por dia (g/dia)

7.8.2 Potenciais mediadores e/ou fatores de confusão

O Quadro 3 apresentam a descrição dos potenciais mediadores e/ou fatores de confusão que serão utilizados nas análises deste projeto de pesquisa para avaliar a associação entre o consumo de leite e derivados e massa óssea.

Especificamente sobre a análise de associação entre o SNP rs4988235 e o desfecho de massa óssea, o ajuste será realizado para as variáveis sexo (feminino e masculino) e ancestralidade genômica (proporção individual de ancestralidade europeia, africana e nativo americana).

Quadro 3: Descrição dos potenciais mediadores e/ou fatores de confusão da coorte de 1982 que serão utilizados na análise do artigo original 1, para a associação entre consumo de leite e massa óssea.

Ano de coleta	Variáveis	Definição	Tipo
1982	Sexo ao nascer	Sexo do recém-nascido	Categórica nominal (masculino; feminino)
1982	Cor da pele	Cor da pele do recém nascido	Categórica nominal (branca; não branca)
1982	Renda familiar	Renda familiar do casal em salários mínimos	Categórica ordinal
1982	Escolaridade materna	Anos de estudo completados com sucesso	Numérica contínua
1982	Idade materna	Idade da mãe no momento do parto	Categórica ordinal
1982	Tabagismo materno na gestação	Fumo materno durante a gravidez	Categórica nominal (não; sim)
1982	Idade gestacional	Semanas de gestação	Numérica discreta
1982	Peso ao nascer	Em gramas	Numérica contínua
2004	Idade da menarca	Em anos completos	Numérica discreta
2004	Consumo de leite	mililitros por dia (ml/dia)	Numérica contínua
2004	Consumo de logurte	mililitros por dia (ml/dia)	Numérica contínua
2004	Consumo de queijo	Em gramas por dia	Numérica contínua
2004	Consumo de requeijão	Em gramas por dia	Numérica contínua
2004/2012	Tabagismo	Uso diário de cigarro no mês anterior a entrevista	Categórica nominal (não; sim)
2004/2012	Consumo de álcool	Consumo de álcool no mês anterior a entrevista	Categórica nominal (não; sim)
2004/2012	Atividade física	Minutos por semana no lazer	Numérica contínua
2004/2012	Altura	Em centímetros (cm)	Numérica contínua
2004/2012	Peso	Em quilogramas (kg)	Numérica contínua
2004/2012	Estado nutricional	IMC (kg/m ²)	Numérica contínua
2012	Paridade	Número de filhos	Numérica discreta

2012	Tempo que amamentou os filhos	Em meses	Numérica discreta
2012	Anticoncepcional oral	Uso de anticoncepcional oral atual	Categórica nominal (não; sim)
2012	Gordura corporal	Em quilogramas (kg)	Numérica contínua
2012	Massa livre de gordura	Em quilogramas (kg)	Numérica contínua

7.9 Coorte de Nascimentos de 1993

7.9.1 Variáveis independentes

Para o artigo original 2, que avaliará os efeitos dos determinantes dietéticos sobre a massa óssea na coorte de 1993, as exposições serão avaliadas nas formas de nutrientes, alimentos e padrões alimentares, conforme descritos a seguir.

7.9.1.1 Exposições como nutrientes e alimentos

Tabela 3: Nutrientes e alimentos que serão utilizados como variáveis independentes para a Coorte de 1993 e suas respectivas unidades de medida.

Nutriente	Unidade de Medida
Proteína	gramas por dia (g/dia)
Cálcio	miligramas por dia (mg/dia)
Vitamina D	microgramas por dia (μ /dia)
Alimento	Unidade de Medida
Leite	porções dia ou mililitros por dia (ml/dia)
Frutas	porções e gramas dia (g/dia)
Vegetais	porções e gramas dia (g/dia)

7.9.1.2 Exposições como padrões alimentares

Além de nutrientes e alimentos, padrões alimentares também serão analisados como exposição. Os padrões alimentares serão obtidos através de análise de componentes principais, na qual entrarão grupos alimentares formados com base na ação dos alimentos sobre o metabolismo do cálcio, no sentido de serem facilitadores ou inibidores de sua absorção ou excreção. Desta forma, os alimentos serão agrupados de acordo com sua quantidade de cálcio em conjunto com nutrientes e substâncias que atuam como facilitadores ou inibidores da absorção de cálcio, resultando em grupos alimentares com efeito positivo e/ou negativo em relação à saúde óssea.

Para a construção desses padrões alimentares, os alimentos contidos nos QFA serão uniformizados em frequência diária de consumo, a fim de obter-se uma unidade única de tempo. Serão considerados contribuintes como carga para

o componente, os grupos alimentares que apresentarem coeficiente de correlação absoluta igual ou maior a 0,30.

Para cada padrão alimentar, será gerado um escore contínuo de adesão que, para fins de análise, será categorizado em tercís, onde o menor tercil representará a menor adesão.

7.9.2 Potenciais mediadores e/ou fatores de confusão

O Quadro 4 apresenta a descrição dos potenciais mediadores e/ou fatores de confusão que serão utilizados nas análises deste projeto de pesquisa para avaliar a associação entre determinantes dietéticos e massa óssea.

Quadro 4: Descrição dos potenciais mediadores e/ou fatores de confusão da coorte de 1993 que serão utilizados na análise do artigo original 2.

Ano de coleta	Variáveis	Definição	Tipo
1993	Sexo ao nascer	Sexo do recém-nascido	Categórica nominal (masculino; feminino)
1993	Idade materna	Idade da mãe em anos completos	Numérica discreta
1993	Escolaridade materna	Escolaridade da mãe em anos completos	Numérica discreta
1993	Renda familiar	Em salários mínimos	Categórica ordinal (em quintis)
1993	Fumo materno na gestação	Se a mãe costumava fumar na gestação	Categórica nominal (não; sim)
1993	Idade gestacional	Semanas de gestação segundo Dubouwitz	Numérica discreta
1993	Peso ao nascer	Em gramas	Numérica contínua
1993	Comprimento ao nascer	Em centímetros	Numérica discreta
2008	Cor da pele	Cor da pele autorreferida	Categórica nominal (branca; não branca)
2008/2011	Estado nutricional	IMC segundo curvas da OMS	Numérica contínua
2008/2011/2015	Tabagismo	Uso diário de cigarro no mês anterior a entrevista	Categórica nominal (não; sim)
2008/2011/2015	Consumo de álcool	Consumo de álcool no mês anterior a entrevista	Categórica nominal (não; sim)
2008/2011/2015	Atividade física	Minutos por semana no lazer	Numérica contínua
2008/2011/2015	Altura	Em centímetros (cm)	Numérica contínua
2008/2011/2015	Peso	Em quilogramas (kg)	Numérica contínua
2011	Idade da menarca	Em anos completos	Numérica discreta
2011	Massa óssea	CMO (g) e DMO (g/cm ²)	Numérica contínua
2011/2015	Gordura corporal	Em quilogramas (kg)	Numérica contínua
2011/2015	Massa livre de gordura	Em quilogramas (kg)	Numérica contínua
2015	Paridade	Número de filhos	Numérica discreta

2015	Tempo que amamentou os filhos	Em meses	Numérica discreta
2015	Uso de anticoncepcional oral	Uso atual de anticoncepcional oral	Categórica nominal (não; sim)
2015	Estado nutricional	IMC (kg/m ²)	Numérica contínua

7.10 Cálculo de tamanho de amostra

Tendo em vista que as exposições de interesse para este estudo foram coletadas em acompanhamentos anteriores, realizou-se um cálculo a fim de identificar quais as diferenças mínimas detectáveis entre as médias de CMO e DMO que o estudo seria capaz de detectar, com um erro alfa de 5% e poder de 80%. Para isso, foram utilizados valores de desvio-padrão (DP) encontrados na literatura para CMO e DMO do corpo inteiro, entre jovens de ambos os sexos com 18 anos de idade (valores de DP para homens: CMO=465,24 g e DMO=0,10 g/cm²; e para mulheres: CMO=396,08 g e DMO=0,08 g/cm²)¹⁸². Em relação às variáveis de exposição, para cada categoria, foram utilizadas as reais proporções que existem no banco de dados da coorte de 1993 no acompanhamento dos 18 anos de idade. Os resultados desses cálculos, estratificado por sexo, são apresentados no Quadro 5.

Quadro 5: Diferenças mínimas detectáveis entre categorias de exposições para DMO (g/cm²) e CMO (g) do corpo inteiro.

Exposição	Homens			Mulheres		
	N	CMO (DP=465,24)	DMO (DP=0,10)	N	CMO (DP=396,08)	DMO (DP=0,08)
Leite*						
Não	634	63,4	0,0136	1127	48,7	0,0098
Sim	1267			964		
Cálcio*						
Não	670	61,8	0,0133	850	49,6	0,0100
Sim	1324			1225		
Proteína*						
Não	903	58,4	0,0126	1150	48,8	0,0098
Sim	1112			941		
Vitamina D*						
Não	928	58,3	0,0125	1125	48,7	0,0098
Sim	1087			966		

*Valores dicotomizados de acordo com a mediana de consumo diário: abaixo (não) e igual ou acima (sim).

7.11 Seleção e treinamento dos entrevistadores

Para a realização dos exames de composição corporal e entrevistas sobre saúde e comportamento dos participantes das coortes de 1982 e 1993, foram selecionados e treinados pessoas com ensino médio completo e maiores de dezoito anos de idade. Após o treinamento, como parte de um treinamento pré-trabalho de campo, todos os selecionados participaram de um estudo piloto, para afinamento da comunicação da equipe e adequação da logística do estudo.

7.12 Logística e coleta de dados

7.12.1 Coorte de Nascimentos de 1982

No acompanhamento em 2004, dados de identificação, como número e nome do participante, nome da mãe e do pai, endereço e telefone foram registrados para posterior contato. Com posse dessas informações, realizaram-se ligações para estes telefones com o objetivo de obter informações atualizadas, porém essa estratégia não foi satisfatória. Então se decidiu enviar rastreadores aos endereços registrados no acompanhamento em 2004. Para essa tarefa foram selecionados motociclistas que deveriam ir ao endereço e obter informações atualizadas do participante. Quatro meses antes do início do trabalho de campo os rastreadores começaram as buscas. Quando o participante era encontrado, era informado sobre o novo acompanhamento e recebia um folder com informações sobre a pesquisa, alguns resultados dos acompanhamentos anteriores e contatos.

Com base nos dados atualizados, os participantes eram contatados por telefones e convidados a comparecerem à clínica localizada nas instalações do Programa em Pós-Graduação em Epidemiologia da UFPel (PPGE/UFPel) com dia e hora marcada. Havia uma pessoa responsável por fazer estes agendamentos. Inicialmente foram agendados 16 adolescentes por dia, oito em cada turno de trabalho. Esse número foi sendo testado e foi aumentando gradativamente até chegar a 25 agendamentos por turno de trabalho.

Durante a visita à clínica, os participantes responderam questionários aplicados em *Netbook*, no qual foram coletadas informações sobre família e moradia, consultas, hospitalização e medicamentos, saúde da mulher, doença respiratória, fraturas, acidentes e violência, atividade física, eventos estressores,

composição familiar, casamento, segunda geração, morbidade dos pais, imagem corporal, escolaridade, trabalho, escala social e renda, alimentação (a partir de QFA), álcool, fumo e saúde mental. Os participantes também responderam questionário auto-aplicado confidencial abordando perguntas sobre uso de drogas, violência e sexualidade.

Na parte dos equipamentos eram realizados os seguintes exames: pletismografia (BodPod®) e densitometria (DXA) para avaliação de composição corporal, avaliação das dimensões corporais (*Photonic Scanner*), espirometria, ultrassom de carótidas, ultrassom abdominal, coleta de sangue, antropometria (pregas cutâneas subescapular, tricípital; circunferência da cintura; perímetro braquial; altura e altura sentado), dinamometria, velocidade da onda de pulso (VOP) e pressão arterial.

Todos os membros da coorte que aceitaram participar do estudo receberam ajuda de custo para cobrir os gastos com o seu deslocamento até a clínica, além de lanche ao final dos exames e atestado, caso necessário, para comprovar falta no trabalho ou estudo, o qual era prontamente fornecido.

7.12.2 Coorte de Nascimentos de 1993

Após o término do acompanhamento dos 18 anos, em março de 2012, iniciou a atualização do banco de endereços dos jovens. Foram realizadas ligações telefônicas para atualização dos endereços e telefones obtidos no passado. A partir de março de 2015, foi utilizado o banco do cartão SUS para identificar os jovens cujo contato telefônico não estava disponível. A partir de setembro, dois rastreadores foram contratados para se deslocarem até os endereços dos jovens que constavam no banco de dados, cujo contato telefônico não foi possível ou não estava disponível, e entregarem o folder com a divulgação do novo acompanhamento. Neste mesmo mês, iniciaram-se as buscas pelos jovens em redes sociais, através do *Facebook*.

Com base nos dados cadastrais atualizados, os participantes foram contatados através de ligações telefônicas, sendo convidados a visitar a clínica localizada nas instalações do PPGE/UFPel para realização de entrevista e avaliação da composição corporal. Inicialmente foram agendados 16 adolescentes por dia, oito em cada turno de trabalho. Esse número foi sendo testado e foi aumentando gradativamente até chegar a 25 agendamentos por

turno de trabalho, com o objetivo de que pelo menos 40 adolescentes visitassem a clínica por dia.

Durante a visita à clínica, todos os participantes responderam a um questionário, o qual era aplicado com auxílio de *Netbook*, através do qual foram coletadas informações sobre estudos, trabalho, família, moradia e renda, gravidez, saúde, trânsito, atividade física, lazer, eventos estressores, fumo e discriminação, álcool e *Self-Reporting Questionnaire* (SRQ). Também foram aplicados testes de avaliação da saúde mental e os participantes preencheram QFA e questionário confidencial.

Foram realizados os seguintes exames: pletismografia (BodPod®) para avaliação de volume corporal e densitometria (DXA) para avaliação de composição corporal, avaliação das dimensões corporais (*Photonic Scanner*), espirometria, difusão pulmonar de monóxido de carbono (DLCO), VOP, pressão arterial, coleta de sangue, antropometria (circunferência da cintura, altura e altura sentado) e dinamometria.

Todos os membros da coorte que aceitaram participar do estudo receberam ajuda de custo para cobrir os gastos com o seu deslocamento até a clínica, além de lanche ao final dos exames e atestado, caso necessário, para comprovar falta no trabalho ou estudo, o qual era prontamente fornecido.

7.13 Estudo piloto

O estudo piloto do último acompanhamento da coorte de 1982, aos 30 anos, foi realizado no dia 29 de maio de 2012, enquanto que o piloto da coorte de 1993 aos 22 anos foi realizado no dia 9 de outubro de 2015.

Eles serviram para uma avaliação prévia de toda logística e funcionamento da clínica das coortes, tendo como responsáveis os coordenadores, pesquisadores, supervisora de campo e doutorandos. Os candidatos aprovados e selecionados para trabalharem em cada acompanhamento foram divididos em dois grupos para que em um momento servissem de “participantes da coorte” 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 da pessoa à clínica, até a 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.

8. SUPERVISÃO E CONTROLE DE QUALIDADE

Durante o acompanhamento de 2012 da coorte de 1982 e de 2015 da coorte de 1983, todos os integrantes 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 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 para aplicação dos instrumentos. Os doutorandos, juntamente com a supervisora do trabalho de campo, controlaram diariamente o desenvolvimento do trabalho dos entrevistadores e as dúvidas eram resolvidas no momento da coleta.

Para garantir a qualidade dos dados coletados, eram realizados o treinamento e aplicação de instrumentos de forma padronizada, treinamento e padronização das medidas antropométricas durante os respectivos trabalhos de campo e calibração periódica dos equipamentos de aferições, obedecendo aos critérios recomendados pelos fabricantes. Além disso, reuniões eram realizadas entre pesquisadores e supervisores e deles com a equipe para padronização de solução de problemas e imprevistos. Uma versão reduzida dos questionários foi reaplicada a 10% da amostra, através de ligação telefônica, para verificar a confiabilidade das respostas e a checagem de inconsistências no banco de dados era realizada em tempo real.

9. PROCESSAMENTO DOS DADOS

Em ambas as coortes, as informações coletadas pelos questionários e outros instrumentos como QFA e aparelhos de composição corporal eram digitadas e/ou armazenadas diretamente nos aparelhos e transmitidas eletronicamente para as bases de dados. As informações provenientes dos diferentes instrumentos serão reunidas e transformadas para posterior processamento e análise no programa Stata 12.1®.

10. ANÁLISE DOS DADOS

10.1 Artigo de revisão

Título sugerido: “Fatores dietéticos e saúde óssea: revisão sistemática da literatura.”

Para a realização da revisão de literatura, inicialmente serão estabelecidas as estratégias de busca, definindo os termos de busca assim como as bases de dados utilizadas. Serão estabelecidos previamente critérios de inclusão e exclusão dos artigos e a revisão será feita em pares, com um terceiro revisor como árbitro, no caso de discordâncias.

Após a seleção dos artigos, aqueles incluídos na revisão serão descritos de acordo com ano de publicação, local de estudo, tipo de delineamento, faixa etária, amostra, tipos de análises e fatores de confusão utilizados nos ajustes, além da avaliação da qualidade.

10.2 Artigo original 1

Título sugerido: “Persistência da lactase e massa óssea: análise de randomização mendeliana na coorte de nascimentos de 1982 de Pelotas, Brasil.”

As análises estatísticas poderão ser realizadas no pacote estatístico Stata 12.1® ou em pacotes estatísticos no programa R. Os desfechos avaliados neste artigo serão: DMO (g/cm^2) e CMO (g) do corpo inteiro, coluna lombar e colo do fêmur aos 30 anos de idade da coorte de nascimentos de 1982. A variável de exposição será o consumo de produtos lácteos (leite, iogurte, queijo e queijo cottage). O SNP rs4988235 será considerado uma variável instrumental, potencial *proxy* genético do consumo de leite.

Na análise descritiva da amostra em estudo, serão mostrados valores de médias e desvios-padrões das variáveis de exposição contínuas e de proporções entre as categorias. A média de consumo de produtos lácteos será descrita conforme variáveis independentes e também, de acordo com o SNP rs4988235.

Para a análise de RM, a associação entre o consumo de leite e derivados e DMO será avaliada a partir de regressão linear simples e múltipla, conforme modelo de análise apresentado na Figura 12. O efeito do SNP sobre DMO será

estimado através de regressão linear simples e múltipla, ajustando para sexo e ancestralidade genômica.

10.3 Artigo original 2

Título sugerido: “Determinantes dietéticos da massa óssea aos 22 anos de idade: análise prospectiva da coorte de nascimentos de 1993 de Pelotas, Brasil.”

As análises estatísticas serão realizadas no pacote estatístico Stata 12.1®, estratificadas por sexo. Os desfechos avaliados neste artigo serão: DMO (g/cm²) e CMO (g) do corpo inteiro, coluna lombar e colo do fêmur aos 22 anos de idade da coorte de nascimentos de 1993. Como variáveis de exposição, será avaliado o consumo de leite, cálcio, proteína, vitamina D e padrões alimentares coletadas nos acompanhamentos dos 15, 18 e 22 anos de idade.

Para exploração dos dados, serão realizadas verificações de normalidade dos desfechos para cada sítio a partir de histograma de frequências, curtose, assimetria e coeficiente de variação. Já na análise descritiva da amostra em estudo, serão mostrados valores de médias e desvios-padrões das variáveis de exposição contínuas e de proporções entre as categorias.

Os desfechos serão analisados como variáveis contínuas, inicialmente descritos de acordo com variáveis demográficas e socioeconômicas. Para avaliar o efeito das exposições principais sobre os desfechos, análises brutas e ajustadas serão realizadas por regressão linear simples e múltipla, respectivamente, para obtenção das estimativas de efeito e seus respectivos intervalos de confiança de 95%. O modelo de análise utilizado está apresentado na Figura 13.

Ainda, pretende-se realizar análise de mediação, a partir de G-Formula, modelagem de equações estruturais (SEM) ou método de estimação de equação generalizada (GEE), a ser definido posteriormente, para estimar os efeitos diretos e indiretos da alimentação sobre os desfechos.

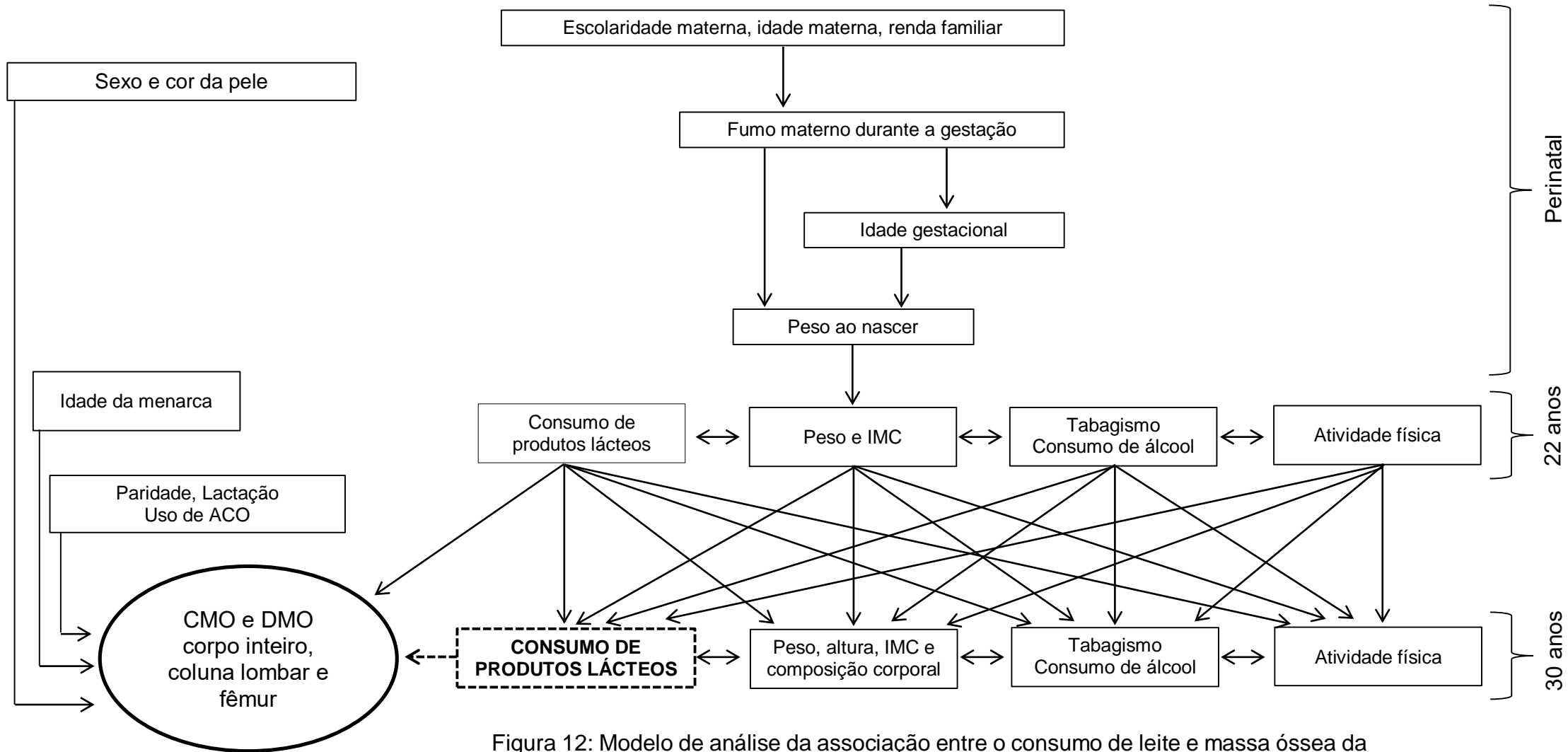


Figura 12: Modelo de análise da associação entre o consumo de leite e massa óssea da Coorte de 1982 para o artigo original 1. A variável na caixa com linha tracejada é a principal exposição de interesse.

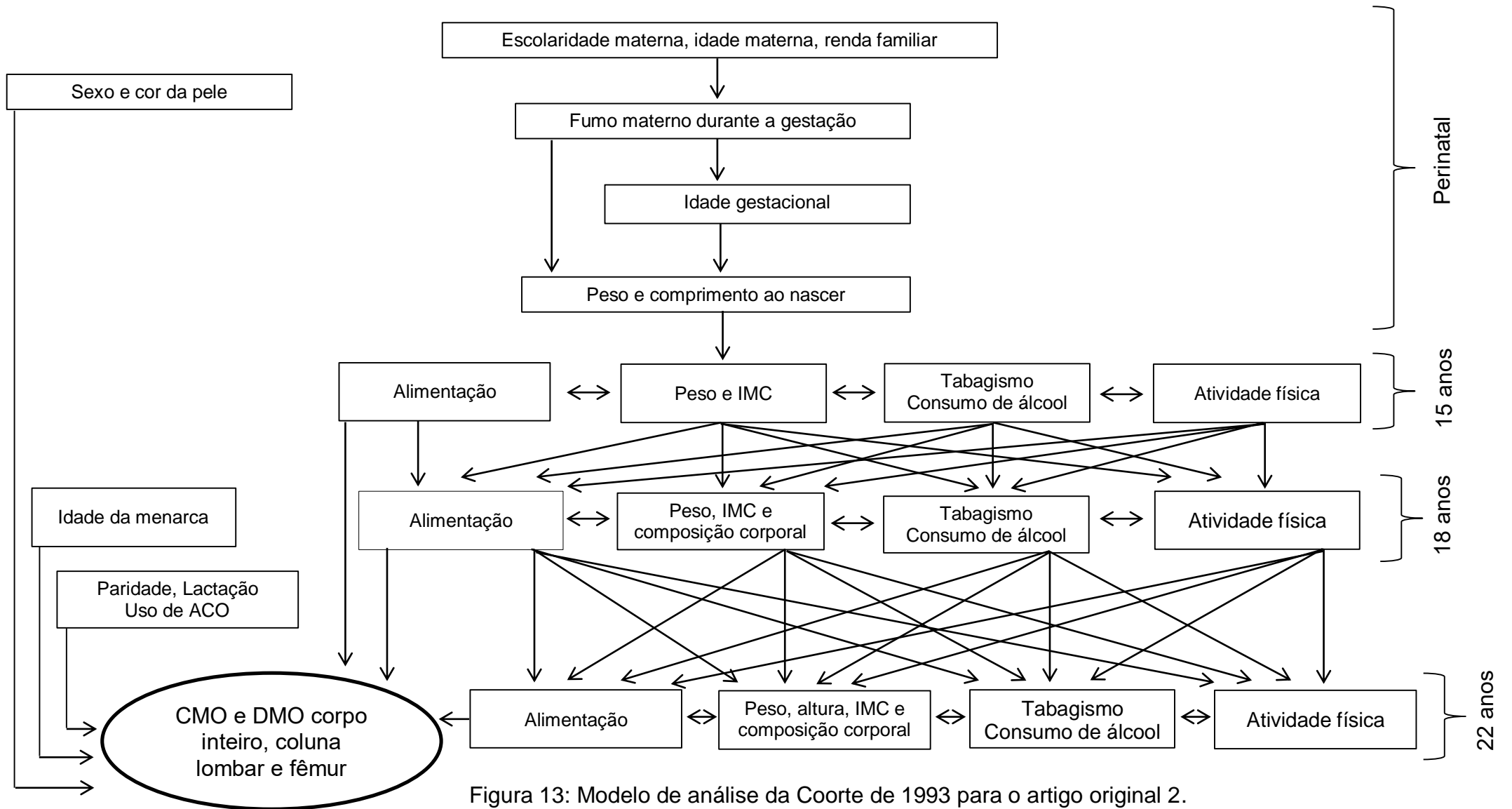


Figura 13: Modelo de análise da Coorte de 1993 para o artigo original 2.

11. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa da coorte de 1982 aos 30 anos, intitulado: “Acompanhamento aos 30 anos de idade dos adultos jovens pertencentes à coorte de nascimentos de 1982: Influências precoces e contemporâneas sobre a composição corporal, capital humano, saúde mental e precursores de doenças crônicas complexas. Pelotas, RS” foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas (Of.16/12). Já o projeto de pesquisa da coorte de 1993 aos 22 anos, intitulado: “Determinantes da obesidade, doenças crônicas, saúde mental e capital humano ao longo do ciclo vital”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas (Of. 1.250.366). Todos os acompanhamentos anteriores de ambas as coortes ocorreram sob critérios éticos e também tiveram seus projetos submetidos à aprovação do mesmo comitê.

Os participantes que aceitaram participar de cada estudo assinaram um consentimento informado por escrito antes da coleta de informações. Nenhum dos procedimentos realizados teve caráter invasivo ou acarretou dano à saúde, mas participantes do sexo feminino eram questionadas sobre a possibilidade de gravidez. As grávidas e suspeitas de estarem grávidas não realizavam os exames.

Em todos os acompanhamentos, os jovens que apresentavam alguma anormalidade, detectada após a realização dos exames eram orientados a procurar os serviços de saúde para serem avaliados e tratados, se necessário.

12. CRONOGRAMA

Ano Bimestre	2015					2016					2017					2018					2019					
	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3
Revisão bibliográfica	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Coleta de dados				■	■	■	■	■	■																	
Elaboração do projeto								■	■	■																
Defesa do projeto										■																
Análise de dados												■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
Redação dos artigos												■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Defesa da tese																									■	

13. DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão divulgados no formato de artigo científico em revistas nacionais e/ou internacionais reconhecidas que sejam devidamente indexadas, sendo a escolha do periódico relacionada à adequação do artigo à revista e ao público que se deseja atingir. Além disso, será enviado um comunicado à imprensa, com texto resumido e em linguagem acessível, permitindo a divulgação dos resultados do estudo em nível local.

14. ORÇAMENTO E FINANCIAMENTO

Este estudo está inserido no Estudo das Coortes de Nascimentos de Pelotas em 1982 e 1993, conduzidos pelo Programa de Pós-graduação em Epidemiologia da Universidade Federal de Pelotas, com o apoio da Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO). De 2004 a 2013, as coortes de nascimentos de 1982 e 1993 foram financiadas pelo *Wellcome Trust*. Fases anteriores do estudo de 1982 foram financiadas pelo *International Development Research Center* (IDRC), Organização Mundial de Saúde, *Overseas Development Administration*, União Europeia, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Ministério da Saúde. Já fases anteriores do estudo de 1993 foram financiadas pela União Europeia, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Ministério da Saúde.

Desta forma, todos os gastos envolvidos no presente projeto estão incluídos nos orçamentos já previstos e não demandará de financiamento extra.

15.REFERÊNCIAS

1. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3:S131–S9.
2. Ward K. Musculoskeletal phenotype through the life course: the role of nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2012 Fev;71(1):27–37.
3. Mora S, Gilsanz V. Establishment of peak bone mass. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2003 Mar;32(1):39-63.
4. The WHO Study Group. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Switzerland: World Health Organization; 1994.
5. Brandão CMA, Camargos BM, Zerbini CA, Plapler PG, Mendonça LMC, Albergaria B, et al. Posições oficiais 2008 da Sociedade Brasileira de Densitometria Clínica (SBDens). *Arq Bra Endocrinol Metab*. 2009;53(1):107-12.
6. Harvey N, dennison E, Cooper C. Osteoporosis: A Lifecourse Approach. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2014;29(9):1917-25.
7. Rizzoli R, Bonjour JP. Determinants of peak bone mass and mechanisms of bone loss. *Osteoporos Int*. 1999;9(Suppl 2):S17-23.
8. Frazão P, Naveira M. Prevalência de osteoporose: uma revisão crítica. *Rev bras epidemiol*. 2006;9(2):206-14.
9. Bachrach LK, Hastie T, Wang MC, Narasimhan B, Marcus R. Bone mineral acquisition in healthy Asian, Hispanic, black, and Caucasian youth: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Dec;84(12):4702-12.
10. Sowers M. Pregnancy and lactation as risk factors for subsequent bone loss and osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 1986 Aug;11(8):1052-60.
11. Nilas L, Christiansen C. Rates of bone loss in normal women: evidence of accelerated trabecular bone loss after the menopause. *Eur J Clin Invest*. 1988 Oct;18(5):529-34.
12. Campos LMA, Liphaut BL, Silva CAA, Pereira RMR. Osteoporose na infância e adolescência. *J Pediatr*. 2003;79(6):481-8.
13. McGuigan FE, Murray L, Gallagher A, Davey-Smith G, Neville CE, Van't Hof R, et al. Genetic and environmental determinants of peak bone mass in young men and women. *J Bone Miner Res* 2002;17(7):1273–9.

14. Cashman KD. Diet, Nutrition, and Bone Health. *J Nutr.* 2007 Nov;137 11 Suppl:2507S–12S.
15. Golden NH, Abrams SA. Optimizing Bone Health in Children and Adolescents. *Pediatrics.* 2014 Oct;134(4):e1229-e43.
16. Rizzoli R. Nutrition: its role in bone health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008 Oct;22(5):813–29.
17. Bonjour JP, Chevalley T, Rizzoli R, Ferrari S. Gene-environment interactions in the skeletal response to nutrition and exercise during growth. *Med Sport Sci.* 2007;51:64-80.
18. McGartland CP, Robson PJ, Murray LJ, Cran GW, Savage MJ, Watkins DC, et al. Fruit and vegetable consumption and bone mineral density: the Northern Ireland Young Hearts Project. *Am J Clin Nutr.* 2004 Oct;80(4):1019-23.
19. Sahni S, Mangano KM, McLean RR, Hannan MT, Kiel DP. Dietary approaches for bone health: lessons from the Framingham Osteoporosis Study. *Curr Osteoporos Rep.* 2015 Aug;13(4):245-55.
20. Pinto Neto AM, Soares A, Urbanetz A, Souza ACA, Ferrari AEM, Amaral B, et al. Consenso Brasileiro de Osteoporose 2002. *Rev Bras Reumatol* 2002;42(6):343- 54.
21. Monjardino T, Lucas R, Ramos E, Barros H. Associations between a priori-defined dietary patterns and longitudinal changes in bone mineral density in adolescents. *Public Health Nutr.* 2014 Jan;17(1):195-205.
22. Smith GD, Ebrahim S. 'Mendelian randomization': can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? *Int J Epidemiol* 2003 Feb;32(1):1–22
23. Smith GD. Capitalising on Mendelian randomization to assess the effects of treatment. *J R Soc Med.* 2007;100:432-5.
24. Lawlor DA, Harbord RM, Sterne JA, Timpson N, Davey Smith G. Mendelian randomization: using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology. *Stat Med.* 2008 Apr;27(8):1133-63.
25. Sheehan NA, Didelez V, Burton PR, Tobin MD. Mendelian randomisation and causal inference in observational epidemiology. *PloS Med.* 2008;5(8):1205–10.

26. Thanassoulis G, O'Donnell CJ. Mendelian randomization: nature's randomized trial in the post genome era. *J Am Med Assoc.* 2009 Jun;301(22):2386–8.
27. Smith GD, Hemani G. Mendelian randomization: genetic anchors for causal inference in epidemiological studies. *Hum Mol Genet.* 2014 Sep 15;23:R89-98.
28. Gardner ED, Gray DJ, O'Rahilly R. *Anatomia: estudo regional do corpo humano.* 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
29. Lippert LS. *Cinesiologia clínica e anatomia.* 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
30. Taichman RS. Blood and bone: Two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem cell niche. *Blood* 2005 Apr 1;105(7):2631-9
31. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido ósseo. In: Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2004. p. 111-128.
32. Adachi T, Aonuma Y, Ito S, Tanaka M, Hojo M, Takano-Yamamoto T, et al. Osteocyte calcium signaling response to bone matrix deformation. *J Biomech.* 2009 Nov;42(15):2507-12.
33. Hill PA, Orth M. Bone remodeling. *Br J Orthod.* 1998;25(2):101-7.
34. Duong LT, Rodan GA. Regulation of osteoclast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001;2(1):95-104.
35. Mundy GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J Periodontal Res.* 1991 May;26:213-7.
36. Sodek J, McKee ME. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology* 2000 Oct;24:99-126.
37. Silva CC, Goldberg TBL, Teixeira AS, Dalmas JC. Mineralização óssea em adolescentes do sexo masculino: anos críticos para a aquisição da massa óssea. *J Pediatr (Rio J).* 2004;80(6):461-7.
38. Pessoa JHL, Lewin S, Longui CA, Mendonça BB, Bianco AC. Densidade mineral óssea: correlação com peso corporal, estatura, idade óssea e fator de crescimento símile à insulina. *J Pediatr (Rio J).* 1997;73(4):259-64.
39. Abrams SA. In utero physiology: role in nutrient delivery and fetal development for calcium, phosphorus, and vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2007 Feb;85(2):604S–7S.

40. van Coeverden SC, Netelenbos JC, de Ridder CM, Roos JC, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA. Bone metabolism markers and bone mass in healthy pubertal boys and girls. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002 Jul;57(1):107-16.
41. Gafni RI, Baron J. Childhood bone mass acquisition and peak bone mass may not be important determinants of bone mass in late adulthood. *Pediatrics*. 2007 Mar;119 Suppl 2:S131-6.
42. Bailey DA, Martin AD, McKay HA, Whiting S, Mirwald R. Calcium accretion in girls and boys during puberty: a longitudinal analysis. *J Bone Miner Res*. 2000 Nov;15(11):2245–50.
43. Gilsanz V, Wren T. Assessment of bone acquisition in childhood and adolescence. *Pediatrics*. 2007 Mar;119 Suppl 2:S145-9.
44. Bachrach LK. Acquisition of optimal bone mass in childhood and adolescence. *Trends Endocrinol Metab*. 2001 Jan-Feb;12(1):22–8.
45. Glastre C, Brailon P, David L, Cochat P, Meunier PJ, Delmas PD. Measurement of bone mineral content of the lumbar spine by dual x-ray absorptiometry in normal children: correlations with growth parameters. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990 May;70(5):1330-3.
46. Matkovic V, Jelic T, Wardlaw GM, Ilich JZ, Goel PK, Wright JK, et al. Timing of peak bone mass in Caucasian females and its implication for the prevention of osteoporosis. Inference from a cross-sectional model. *J Clin Invest* 1994 Feb;93(2):799–808.
47. Katzman DK, Bachrach LK, Carter DR, Marcus R. Clinical and anthropometric correlates of bone mineral acquisition in healthy adolescent girls. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991 Dec;73(6):1332-9.
48. Heaney RP, Barger-Lux MJ, Davies KM, Ryan RA, Johnson ML, Gong G. Bone dimensional change with age: interactions of genetic, hormonal, and body size variables. *Osteoporos Int*. 1997;7:426-31.
49. Chun KJ. Bone Densitometry. *Semin Nucl Med*. 2011;41:220-8.
50. Sheu A, Diamond T. Bone mineral density: testing for osteoporosis. *Australian Prescriber*. 2016;39:35–9.
51. Lupsa BC, Insogna K. Bone Health and Osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2015 Sep;44(3):517-30.

52. Boot AM, Bouquet J, Ridder MAJ, Krenning EP, Keizer-Schrama SMPFM. Determinants of body composition measures by dual energy x-ray absorptiometry in Dutch children and adolescents. *Am J Clin Nutr.* 1997;66:232-8.
53. Plank LD. Dual-energy X-ray absorptiometry and body composition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2005 May;8(3):305-9.
54. Slosman DO, Casez JP, Pichard C, Rochat T, Fery F, Rizzoli R, et al. Assessment of whole-body composition with dual-energy x-ray absorptiometry. *Radiology.* 1992 Nov;185(2):593-98.
55. 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.
56. Cvijetic S, Colic Baric I, Satalic Z. Influence of heredity and environment on peak bone density: a parent-offspring study. *J Clin Densitom.* 2010 Jul-Sep;13(3):301-6.
57. Shaffer JR, Kammerer CM, Bruder JM, Cole SA, Dyer TD, Almasy L, et al. Genetic influences on bone loss in the San Antonio Family Osteoporosis study. *Osteoporos Int.* 2008 Dec;19(12):1759-67.
58. Zhai G, Andrew T, Kato BS, Blake GM, Spector TD. Genetic and environmental determinants on bone loss in postmenopausal Caucasian women: a 14-year longitudinal twin study. *Osteoporos Int.* 2009 Jun;20(6):949-53.
59. Arabi A, Tamim H, Nabulsi M, Maalouf J, Khalife H, Choucair M, et al. Sex differences in the effect of body-composition variables on bone mass in healthy children and adolescents. *Am J Clin Nutr.* 2004 Nov;80(5):1428-35.
60. Lei SF, Deng FY, Li MX, Dvornyk V, Deng HW. Bone mineral density in elderly Chinese: effects of age, sex, weight, height, and body mass index. *J Bone Miner Metab.* 2004;22(1):71-8.
61. Maynard LM, Guo SS, Chumlea WC, Roche AF, Wisemandle WA, Zeller CM, et al. 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.* 1998 Nov;68(5):1111-7.
62. Lantz H, Bratteby LE, Fors H, Sandhagen B, Sjöström L, Samuelson G. Body composition in a cohort of Swedish adolescents aged 15, 17 and 20.5 years. *Acta Paediatr.* 2008 Dec;97(12):1691-7.

63. Looker AC, Melton LJ, Harris T, Borrud L, Shepherd J, McGowan J. Age, gender, and race/ethnic differences in total body and subregional bone density. *Osteoporos Int.* 2009 Jul;20(7):1141-9.
64. Chantler S, Dickie K, Goedecke JH, Levitt NS, Lambert EV, Evans J, et al. Site-specific differences in bone mineral density in black and white premenopausal South African women. *Osteoporos Int.* 2012 Feb;23(2):533-42.
65. Clark EM, Ness A, Tobias JH, ALSPAC Study Team. Social position affects bone mass in childhood through opposing actions on height and weight. *J Bone Miner Res.* 2005 Dec;20(12):2082-9.
66. Cooper C, Westlake S, Harvey N, Javaid K, Dennison E, Hanson M. Review: developmental origins of osteoporotic fracture. *Osteoporos Int.* 2006;17(3):337-47.
67. Winsloe C, Earl S, Dennison EM, Cooper C, Harvey NC. Early life factors in the pathogenesis of osteoporosis. *Current osteoporosis reports.* 2009 Dec;7(4):140-4.
68. Steer CD, Tobias JH. Insights into the programming of bone development from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Am J Clin Nutr.* 2011 Dec;94 Suppl 6:1861S-4S.
69. Ganpule A, Yajnik CS, Fall CH, Rao S, Fisher DJ, Kanade A, et al. Bone mass in Indian children--relationships to maternal nutritional status and diet during pregnancy: the Pune Maternal Nutrition Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Aug;91(8):2994-3001.
70. Tobias JH, Steer CD, Emmett PM, Tonkin RJ, Cooper C, Ness AR, et al. Bone mass in childhood is related to maternal diet in pregnancy. *Osteoporos Int.* 2005 Dec;16(12):1731-41.
71. Jensen RB, Vielwerth S, Frystyk J, Veldhuis J, Larsen T, Mølgaard C, et al. Fetal growth velocity, size in early life and adolescence, and prediction of bone mass: association to the GH-IGF axis. *J Bone Miner Res.* 2008 Mar;23(3):439-46.
72. Sayers A, Tobias JH. Estimated maternal ultraviolet B exposure levels in pregnancy influence skeletal development of the child. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Mar;94(3):765-71.
73. Godfrey K, Walker-Bone K, Robinson S, Taylor P, Shore S, Wheeler T, et al. Neonatal bone mass: influence of parental birthweight, maternal smoking,

body composition, and activity during pregnancy. *J Bone Miner Res.* 2001 Sep;16(9):1694-703.

74. Jones G, Riley M, Dwyer T. Maternal smoking during pregnancy, growth, and bone mass in prepubertal children. *J Bone Miner Res.* 1999 Jan;14(1):146-51.

75. Avila-Diaz M, Flores-Huerta S, Martinez-Muniz I, Amato D. 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. *Arch Med Res.* 2001 Jul-Aug;32(4):288-92.

76. Beltrand J, Alison M, Nicolescu R, Verkauskiene R, Deghmoun S, Sibony O, et al. Bone mineral content at birth is determined both by birth weight and fetal growth pattern. *Pediatric research.* 2008 Jul;64(1):86-90.

77. Schlussek MM, de Castro JA, Kac G, da Silva AA, Cardoso VC, Bettiol H, et al. Birth weight and bone mass in young adults from Brazil. *Bone.* 2010 Apr;46(4):957-63.

78. Jones G, Dwyer T. Birth weight, birth length, and bone density in prepubertal children: evidence for an association that may be mediated by genetic factors. *Calcif Tissue Int.* 2000 Oct;67(4):304-8.

79. Fewtrell, Prentice A, Cole TJ, Lucas A. Effects of growth during infancy and childhood on bone mineralization and turnover in preterm children aged 8-12 years. *Acta Paediatr.* 2000 Feb;89(2):148-53.

80. Cooper C, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C, Tuomilehto J, Barker DJ. Maternal height, childhood growth and risk of hip fracture in later life: a longitudinal study. *Osteoporosis Int* 2001;12(8):623-9.

81. Muniz LC, Menezes AM, Assunção MC, Wehrmeister FC, Martínez-Mesa J, Gonçalves H, et al. Breastfeeding and Bone Mass at the Ages of 18 and 30: Prospective Analysis of Live Births from the Pelotas (Brazil) 1982 and 1993 Cohorts. *PLoS One.* 2015 Apr;10(4):e0122759.

82. 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 Dec;94(6):1865S-9S.

83. Ay L, Jaddoe VW, Hofman A, Moll HA, Raat H, Steegers EA, et al. Foetal and postnatal growth and bone mass at 6 months: the Generation R Study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011 Feb;74(2):181-90.

84. Mughal MZ, Khadilkar AV. The accrual of bone mass during childhood and puberty. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2011 Feb;18(1):28-32.
85. Goulding A, Jones IE, Taylor RW, Williams SM, Manning PJ. Bone mineral density and body composition in boys with distal forearm fractures: a dual-energy x-ray absorptiometry study. *J Pediatr.* 2001 Oct;139(4):509-15.
86. Skaggs DL, Loro ML, Pitukcheewanont P, Tolo V, Gilsanz V. Increased body weight and decreased radial cross-sectional dimensions in girls with forearm fractures. *J Bone Miner Res.* 2001 Jul;16(7):1337-42. .
87. Goulding A, Jones IE, Taylor RW, Manning PJ, Williams SM. More broken bones: a 4-year double cohort study of young girls with and without distal forearm fractures. *J Bone Miner Res.* 2000 Oct;15(10):2011-8.
88. Gordon CM. Normal Bone Accretion and Effects of Nutritional Disorders in Childhood. *J Womens Health (Larchmt).* 2003 Mar;12(2):137-43.
89. Schneider M, Fisher M, Weinerman S, Lesser M. Correlates of low bone density in females with anorexia nervosa. *Int J Adolesc Med Health.* 2002 Oct-Dec;14(4):297-306.
90. Harvey NC, Cole ZA, Crozier SR, Kim M, Ntani G, Goodfellow L, et al. Physical activity, calcium intake and childhood bone mineral: a population-based cross-sectional study. *Osteoporos Int.* 2011 Jan;23(1):121-30.
91. Anderson JJ. The important role of physical activity in skeletal development: how exercise may counter low calcium intake. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(6):1384-6.
92. Hasselstrøm H, Karlsson KM, Hansen SE, Grønfeldt V, Froberg K, Andersen LB. Peripheral bone mineral density and different intensities of physical activity in children 6-8 years old: the Copenhagen School Child Intervention study. *Calcif Tissue Int.* 2007 Jan;80(1):31-8.
93. Boot AM, de Ridder MA, Pols HA, Krenning EP, de Muinck Keizer-Schrama SM. Bone mineral density in children and adolescents: relation to puberty, calcium intake, and physical activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Jan;82(1):57-62.
94. Gracia-Marco L, Moreno LA, Ortega FB, León F, Sioen I, Kafatos A, et al. Levels of physical activity that predict optimal bone mass in adolescents: the HELENA study. *Am J Prev Med.* 2011;40(6):599-607.

95. Bakker I, Twisk JW, Van Mechelen W, Roos JC, Kemper HC. Ten-year longitudinal relationship between physical activity and lumbar bone mass in (young) adults. *J Bone Miner Res.* 2003 Feb;18(2):325-32.
96. Bleicher K, Cumming RG, Naganathan V, Seibel MJ, Sambrook PN, Blyth FM, et al. Lifestyle factors, medications, and disease influence bone mineral density in older men: findings from the CHAMP study. *Osteoporos Int* 2011 Sep;22(9):2421-37.
97. Mavroedi AAD, Stewart AD, Reid DM, Macdonald HM. Physical activity and dietary calcium interactions in bone mass in Scottish postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2009 Mar;20(3):409-16.
98. Prentice A. Diet, nutrition and the prevention of osteoporosis. *Public Health Nutrition.* 2004;7(1A):227-43.
99. Brandão CMA, Vieira JGH. Fatores Envolvidos no Pico de Massa Óssea. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 1999 Dec;43(6):401-9.
100. Yoon V, Maalouf NM, Sakhaee K. The effects of smoking on bone metabolism. *Osteoporos Int.* 2012 Aug;23(8):2081-92.
101. Maurel DB, Boisseau N, Benhamou CL, Jaffre C. Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms. *Osteoporos Int.* 2012 Jan;23(1):1-16.
102. Frost HM. Obesity, and bone strength and mass: a tutorial based on insights from a new paradigm. *Bone.* 1997 Sep;21(3):211-4.
103. Lim S, Joung H, Shin CS, Lee HK, Kim KS, Shin EK, et al. Body composition changes with age have gender-specific impacts on bone mineral density. *Bone.* 2004 Set;35(3):792-8.
104. Jurimae T, Soot T, Jurimae J. Relationships of anthropometrical parameters and body composition with bone mineral content or density in young women with different levels of physical activity. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci.* 2005 Nov;24(6):579-87.
105. Ho-Pham LT, Nguyen ND, Lai TQ, Nguyen T. Contributions of lean mass and fat mass to bone mineral density: a study in postmenopausal women. *BMC Musculoskelet Disord.* 2010;11:59.
106. Prior JC, Kirkland SA, Joseph L, Kreiger N, Murray TM, Hanley DA, et al. Oral contraceptive use and bone mineral density in premenopausal women: cross-sectional, population-based data from the Canadian Multicentre Osteoporosis Study. *CMAJ.* 2001 Oct;165(8):1023-9.

107. Hartard M, Kleinmond C, Wiseman M, Weissenbacher ER, Felsenberg D, Erben RG. Detrimental effect of oral contraceptives on parameters of bone mass and geometry in a cohort of 248 young women. *Bone*. 2007 Feb;40(2):444-50.
108. Pikkarainen E, Lehtonen-Veromaa M, Möttönen T, Kautiainen H, Viikari J. Estrogen-progestin contraceptive use during adolescence prevents bone mass acquisition: a 4-year follow-up study. *Contraception*. 2008 Sep;78(3):226-31.
109. Lloyd T, Buchanan JR, Ursino GR, Myers C, Woodward G, Halbert DR. Long-term oral contraceptive use does not affect trabecular bone density. *Am J Obstet Gynecol*. 1989 Feb;160(2):402-4.
110. Ward KA, Adams JE, Mughal MZ. Bone status during adolescence, pregnancy and lactation. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2005 Aug;17(4):435-9.
111. Cashman KD. Diet and control of osteoporosis. In: Remacle C, Reusens B, editors. *Functional foods, ageing and degenerative disease*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited; 2004. p. 83–114.
112. Ilich JZ, Kerstetter JE. Nutrition in Bone Health Revisited: A Story Beyond Calcium. *J Am Coll Nutr* 2000 Nov-Dec;19(6):715-37.
113. Kemi VE, Kärkkäinen MU, Lamberg-Allardt CJ. High phosphorus intakes acutely and negatively affect Ca and bone metabolism in a dose-dependent manner in healthy young females. *Br J Nutr*. 2006 Sep;96(3):545-53.
114. Ginty F. Dietary protein and bone health. *Proc Nutr Soc*. 2003 Nov;62(4):867–76.
115. Heaney RP. Role of dietary sodium in osteoporosis. *J Am Coll Nutr*. 2006 Jun;25 3 Suppl:271S–6S.
116. Matkovic V, Ilich JZ, Andon MB, Hsieh LC, Tzagournis MA, Lagger BJ, et al. Urinary calcium, sodium, and bone mass of young females. *Am J Clin Nutr*. 1995 Aug;62(2):417-25.
117. Kerstetter JE, Allen LH. Protein intake and calcium homeostasis. *Adv Nutr Res*. 1994;9:167-81.
118. Massey LK, Wise KJ. The effect of dietary caffeine on urinary excretion of calcium, magnesium, sodium and potassium in healthy young females. *Nutrition Research*. 1984 Jan-Feb;4(1):43–50.
119. Massey LK, Hollingbery PW. Acute effects of dietary caffeine and sucrose on urinary mineral excretion of healthy adolescents. *Nutrition Research*. 1988;8(9):1005-12.

120. Jugdaohsingh R, O'Connell MA, Sripanyakorn S, Powell JJ. Moderate alcohol consumption and increased bone mineral density: potential ethanol and non-ethanol mechanisms. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2006 Aug;65(3):291-310.
121. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007 Jul;357(3):266–81.
122. Binkley NC, Suttie JW. Vitamin K nutrition and osteoporosis. *J Nutr*. 1995 Jul;125(7):1812–21.
123. Maggiolini M, Bonofiglio D, Giorno A, Catalano S, Marsico S, Aquila S, et al. The effect of dietary calcium intake on bone mineral density in healthy adolescent girls and young women in southern Italy. *Int J Epidemiol*. 1999 Jun;28(3):479-84.
124. Ito S, Ishida H, Uenishi K, Murakami K, Sasaki S. The relationship between habitual dietary phosphorus and calcium intake, and bone mineral density in young Japanese women: a cross-sectional study. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2011;20(3):411-7.
125. Tereszowski CM, Simpson JA, Whiting SJ, Buchholz AC. Body mass, vitamin D and alcohol intake, lactose intolerance, and television watching influence bone mineral density of young, healthy Canadian women. *J Am Coll Nutr*. 2012 Feb;31(1):24-31.
126. Carter LM, Whiting SJ, Drinkwater DT, Zello GA, Faulkner RA, Bailey DA. Self-reported calcium intake and bone mineral content in children and adolescents. *J Am Coll Nutr*. 2001 Oct;20(5):502-9.
127. Li JJ, Huang ZW, Wang RQ, Ma XM, Zhang ZQ, Liu Z, et al. Fruit and vegetable intake and bone mass in Chinese adolescents, young and postmenopausal women. *Public Health Nutr*. 2013 Jan;16(1):78-86.
128. Hu FB. Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology. *Curr Opin Lipidol* 2002 Feb;13(1):3-9.
129. Kant AK. Dietary patterns and health outcomes. *J Am Diet Assoc* 2004 Apr;104(4):615-35.
130. McNaughton SA, Ball K, Mishra GD, Crawford DA. Dietary patterns of adolescents and risk of obesity and hypertension. *J Nutr*. 2008 Feb;138(2):364-70.

131. Tucker KL, Chen H, Hannan MT, Cupples LA, Wilson PW, Felson D, et al. Bone mineral density and dietary patterns in older adults: the Framingham Osteoporosis Study. *Am J Clin Nutr.* 2002 Jul;76(1):245–52.
132. Okubo H, Sasaki S, Horiguchi H, Oguma E, Miyamoto K, Hosoi Y, et al. Dietary patterns associated with bone mineral density in premenopausal Japanese farmwomen. *Am J Clin Nutr.* 2006 May;83(5):1185-92.
133. Kontogianni MD, Melistas L, Yannakoulia M, Malagaris I, Panagiotakos DB, Yiannakouris N. Association between dietary patterns and indices of bone mass in a sample of Mediterranean women. *Nutrition.* 2009 Feb;25(2):165-71.
134. Thomas DC, Conti DV. Commentary: the concept of 'Mendelian randomization'. *Int J Epidemiol.* 2004;33:21-5.
135. Kemp JP, Sayers A, Smith GD, Tobias JH, Evans DM. Using Mendelian randomization to investigate a possible causal relationship between adiposity and increased bone mineral density at different skeletal sites in children. *Int J Epidemiol.* 2016 May:1-13.
136. Haycock PC, Burgess S, Wade KH, Bowden J, Relton C, Smith GD. Best (but oft-forgotten) practices: the design, analysis, and interpretation of Mendelian randomization studies. *Am J Clin Nutr.* 2016 Apr;104(3):965-78.
137. Mattar R, Mazo DFC, Carrilho FJ. Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. *Clin Exp Gastroenterol.* 2012;5:113–21.
138. Ingram CJ, Mulcare CA, Itan Y, Thomas MG, Swallow DM. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Hum Genet.* 2009 Jan;124(6):579-91.
139. Swallow DM. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu Rev Genet.* 2003;37:197-219.
140. Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Järvelä I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet.* 2002 Feb;30(2):233-7.
141. Rasinperä H, Savilahti E, Enattah NS, Kuokkanen M, Tötterman N, Lindahl H, et al. A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut.* 2004 Nov;53(11):1571–6.
142. Enattah NS, Kuokkanen M, Forsblom C, Ntaha S, Oksanen A, Jarvela I, et al. Correlation of intestinal disaccharidase activities with the C/T-13910 variant and age. *World J Gastroenterol.* 2007 Jul;13(25):3508-12.

143. Monjardino T, Lucas R, Ramos E, Lopes C, Gaio R, Barros H. Associations between a posteriori defined dietary patterns and bone mineral density in adolescents. *Eur J Nutr.* 2014 Mar;54(2):273-82.
144. Shin S, Hong K, Kang SW, Joung H. A milk and cereal dietary pattern is associated with a reduced likelihood of having a low bone mineral density of the lumbar spine in Korean adolescents. *Nutr Res.* 2013 Jan;33(1):59-66.
145. Song Y, Paik HY, Joung H. Soybean and soy isoflavone intake indicate a positive change in bone mineral density for 2 years in young Korean women. *Nutr Res.* 2008 Jan;28(1):25-30.
146. Kalkwarf HJ, Khoury JC, Lanphear BP. Milk intake during childhood and adolescence, adult bone density, and osteoporotic fractures in US women. *Am J Clin Nutr.* 2003 Jan;77(1):257-65.
147. Foo LH, Zhang Q, Zhu K, Ma G, Greenfield H, Fraser DR. Influence of body composition, muscle strength, diet and physical activity on total body and forearm bone mass in Chinese adolescent girls. *Br J Nutr.* 2007 Dec;98(6):1281-7.
148. Bedford JL, Barr SI. Higher urinary sodium, a proxy for intake, is associated with increased calcium excretion and lower hip bone density in healthy young women with lower calcium intakes. *Nutrients.* 2011 Nov;3(11):951-61.
149. Beasley JM, Ichikawa LE, Ange BA, Spangler L, LaCroix AZ, Ott SM, et al. Is protein intake associated with bone mineral density in young women? *Am J Clin Nutr.* 2010 May;91(5):1311-6.
150. Lotborn M, Bratteby LE, Samuelson G, Ljunghall S, Sjostrom L. Whole-body bone mineral measurements in 15-year-old Swedish adolescents. *Osteoporos Int.* 1999;9(2):106-14.
151. Lloyd T, Rollings NJ, Kieselhorst K, Egli DF, Mauger E. Dietary caffeine intake is not correlated with adolescent bone gain. *J Am Coll Nutr.* 1998 Oct;17(5):454-7.
152. Wang MC, Aguirre M, Bhudhikanok GS, Kendall CG, Kirsch S, Marcus R, et al. Bone mass and hip axis length in healthy Asian, black, Hispanic, and white American youths. *J Bone Miner Res.* 1997 Nov;12(11):1922-35.
153. Henderson NK, Price RI, Cole JH, Gutteridge DH, Bhagat CI. Bone density in young women is associated with body weight and muscle strength but not dietary intakes. *J Bone Miner Res.* 1995 Mar;10(3):384-93.

154. Recker RR, Davies KM, Hinders SM, Heaney RP, Stegman MR, Kimmel DB. Bone gain in young adult women. *JAMA*. 1992 Nov 4;268(17):2403-8.
155. Rodrigues PRM, Pereira RA, Cunha DB, Sichieri R, Ferreira MG, Vilela AAF, et al. Fatores associados a padrões alimentares em adolescentes: um estudo de base escolar em Cuiabá, Mato Grosso. *Rev Bras Epidemiol*. 2012;15(3):662-74.
156. Gugatschka M, Hoeller A, Fahrleitner-Pammer A, Dobnig H, Pietschmann P, Kudlacek S, et al. Calcium supply, bone mineral density and genetically defined lactose maldigestion in a cohort of elderly men. *J Endocrinol Invest*. 2007 Jan;30(1):46-51.
157. Koek WN, van Meurs JB, van der Eerden BC, Rivadeneira F, Zillikens MC, Hofman A, et al. The T-13910C polymorphism in the lactase phlorizin hydrolase gene is associated with differences in serum calcium levels and calcium intake. *J Bone Miner Res*. 2010 Sep;25(9):1980-7.
158. Obermayer-Pietsch BM, Bonelli CM, Walter DE, Kuhn RJ, Fahrleitner-Pammer A, Berghold A, et al. Genetic predisposition for adult lactose intolerance and relation to diet, bone density, and bone fractures. *J Bone Miner Res*. 2004 Jan;19(1):42-7.
159. Bácsi K, Kósa JP, Lazáry Á, Balla B, Horváth H, Kis A, et al. LCT 13910 C/T polymorphism, serum calcium, and bone mineral density in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2009;20:639-45.
160. Enattah N, Välimäki VV, Välimäki MJ, Löyttyniemi E, Sahi T, Järvelä I. Molecularly defined lactose malabsorption, peak bone mass and bone turnover rate in young finnish men. *Calcif Tissue Int*. 2004 Dec;75(6):488-93.
161. Laaksonen MM, Impivaara O, Sievänen H, Viikari JS, Lehtimäki TJ, Lamberg-Allardt CJ, et al. Associations of genetic lactase non-persistence and sex with bone loss in young adulthood. *Bone*. 2009;44(5):1003-9.
162. Agueda L, Urreizti R, Bustamante M, Jurado S, Garcia-Giralt N, Díez-Pérez A, et al. Analysis of three functional polymorphisms in relation to osteoporosis phenotypes: replication in a Spanish cohort. *Calcif Tissue Int*. 2010 Jul;87(1):14-24.
163. Enattah NS, Sulkava R, Halonen P, Kontula K, Järvelä I. Genetic variant of lactase-persistent C/T-13910 is associated with bone fractures in very old age. *J Am Geriatr Soc*. 2005 Jan;53(1):79-82.

164. Hartwig FP, Horta BL, Smith GD, Mola CL, Victora CG. Association of lactase persistence genotype with milk consumption, obesity and blood pressure: a Mendelian randomization study in the 1982 Pelotas (Brazil) Birth Cohort, with a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 2016 May;1-13.
165. Lau EMC, Lynn H, Chan YH, Lau W, Woo J. Benefits of milk powder supplementation on bone accretion in Chinese children. *Osteoporos Int*. 2004 Aug;15(8):654-8.
166. Du X, Zhu K, Trube A, Zhang Q, Ma G, Hu X, et al. School-milk intervention trial enhances growth and bone mineral accretion in Chinese girls aged 10-12 years in Beijing. *Br J Nutr*. 2004 Jul;92(1):159-68.
167. Cheng S, Lyytikäinen A, Kröger H, Lamberg-Allardt C, Alén M, Koistinen A, et al. Effects of calcium, dairy product, and vitamin D supplementation on bone mass accrual and body composition in 10Y12-y-old girls: a 2-y randomized trial. *Am J Clin Nutr*. 2005 Nov;82(5):1115-26.
168. Moschonis G, Manios Y. Skeletal site-dependent response of bone mineral density and quantitative ultrasound parameters following a 12-month dietary intervention using dairy products fortified with calcium and vitamin D: the Postmenopausal Health Study. *Br J Nutr*. 2006 Dec;96(6):1140-48.
169. Lacativa PG, Farias ML. Office practice of osteoporosis evaluation. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006 Aug;50(4):674-84.
170. Goldberg TB, Silva CC. Osteoporose é uma doença que afeta crianças e adolescentes? *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80:165-6.
171. Walsh JS, Henry YM, Fatayerji D, Eastell R. Lumbar spine peak bone mass and bone turnover in men and women: a longitudinal study. *Osteoporos Int*. 2009 Mar;20(3):355-62.
172. Victora CG, Barros FC, Lima RC, Behaguel DP, Gonçalves H, Horta BL, et al. The Pelotas birth cohort study, Rio Grande do Sul, Brazil, 1982-2001. *Cad Saude Publica*. 2003 Sept./Oct.;19(5):1241-56.
173. Barros FC, Victora CG, Horta BL, Gigante DP. Metodologia do estudo da coorte de nascimentos de 1982 a 2004-5, Pelotas, RS. *Rev Saude Publica*. 2008;42:7-15.
174. Victora CG, Barros FC. Cohort profile: The 1982 Pelotas (Brazil) birth cohort study. *Int J Epidemiol* 2006;35(2):237-42.

175. Horta BL, Gigante DP, Gonçalves H, Motta JVS, Mola CL, Oliveira IO, et al. Cohort Profile Update: The 1982 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. *Int J Epidemiol* 2015;44(2):441-e.
176. Victora CG, Hallal PC, Araújo CLP, Menezes AMB, Wells JCK, Barros FC. Cohort profile: the 1993 Pelotas (Brazil) birth cohort study. *Int J Epidemiol* 2008;37:704-9.
177. Gonçalves H, Assunção MCF, Wehrmeister FC, Oliveira IO, Barros FC, Victora CG, et al. Cohort Profile update: The 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort follow-up visits in adolescence. *Int J Epidemiol* 2014:1-7.
178. Schneider BC, Motta JVS, Muniz LC, Bielemann RM, Madruga SW, Orlandi SP, et al. Desenho de um questionário de frequência alimentar digital autoaplicado para avaliar o consumo alimentar de adolescentes e adultos jovens: coortes de nascimentos de Pelotas, Rio Grande do Sul. *Rev bras epidemiol.* 2016;19(2):419-32.
179. Troelsen JT, Olsen J, Moller J, Sjostrom H. An upstream polymorphism associated with lactase persistence has increased enhancer activity. *Gastroenterology.* 2003;125:1686-94.
180. Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Jarvela I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet.* 2002;30:233-37.
181. Lewinsky RH, Jensen TG, Moller J, Stensballe A, Olsen J, Troelsen JT. T-13910 DNA variant associated with lactase persistence interacts with Oct-1 and stimulates lactase promoter activity in vitro. *Hum Mol Genet.* 2005;14:3945-53.
182. Muniz LC, Menezes AMB, Assunção MCF, Martínez-Mesa J, Wehrmeister FC, Howe LD, et al. Body mass index at 11 years and bone mass at age 18: path analysis within the 1993 Pelotas (Brazil) birth cohort study. *BMC Musculoskeletal Disorders.* 2015;16(71):1-7.

ANEXOS

Anexo 1 – QFA aplicado aos 30 anos na Coorte de 1982 e aos 18 anos na Coorte de 1993

Nome: _____ ID: _____

Data entrevista: _____ Entrevistadora: _____

ALIMENTO	FREQUÊNCIA								QUANTIDADE				ÉPOCA	
	CEREAIS E TUBÉRCULOS	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"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Pão integral ou preto	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 fatias	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Pão branco	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Pão caseiro	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Macarrão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pegador	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Farinha de mandioca	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Bolacha doce ou recheada	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	5 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Bolacha salgada	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	5 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Bolo sem recheio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia grande	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Batata cozida	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	4 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Batata frita	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pires	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Polenta frita	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pires	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

Aipim frito	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pires	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Milho na espiga	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 espigas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

ALIMENTO	FREQUÊNCIA								QUANTIDADE				ÉPOCA
LEITE E DERIVADOS	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"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Iogurte	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Queijo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Requeijão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
ALIMENTO	FREQUÊNCIA								QUANTIDADE				ÉPOCA
FRUTAS, VERDURAS E LEGUMES	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"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Banana	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 unidades (banana prata)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Mamão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Maçã	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Melancia ou melão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Abacaxi	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Abacate	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Manga	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	½ unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Morango	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pires	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Uva	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 cacho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Pêssego	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Goiaba	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pêra	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Alface	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 folha	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Tomate	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	5 rodela	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Cebola	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Alho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 dente	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Couve	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Repolho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Chuchu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Abóbora	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Pepino ao natural	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	5 rodela	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Vagem	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Cenoura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Beterraba	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Couve-flor	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pires	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Pimentão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

ALIMENTO	FREQUÊNCIA								QUANTIDADE			ÉPOCA	
	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
LEGUMINOSAS													
Feijão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 concha	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

Lentilha, ervilha, grão de bico	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 concha	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
---------------------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	----------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	--

ALIMENTO	FREQUÊNCIA								QUANTIDADE			ÉPOCA	
	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
Carne com osso tipo costela, paleta, agulha	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<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"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<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"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pedaço grande	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Frango assado	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 sobrecoxa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Frango frito	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 coxas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Peixe	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 filé grande	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Camarão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<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"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Vísceras (rim/fígado/coração/moela)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 bife ou 3 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Salsicha ou linguiça	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Mortadela, presunto, salame	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Bacon/toucinho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<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"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Ovos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

ALIMENTO	FREQUÊNCIA								QUANTIDADE				ÉPOCA
	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	
GORDURAS													
Manteiga	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 col chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Margarina	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 col chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Maionese	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

ALIMENTO	FREQUÊNCIA								QUANTIDADE				ÉPOCA
	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	
AÇÚCARES E DOCES													
Açúcar	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 col chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Sorvete e picolé	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<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"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	4 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Pudim ou doces	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Chocolate em pó ou Nescau	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Chocolate em barra ou bombom	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 barra pequena ou 1 bombom	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

ALIMENTO	FREQUÊNCIA								QUANTIDADE				ÉPOCA
	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	
BEBIDAS													
Refrigerante normal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Refrigerante light/diet/zero	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Suco de caixa ou pó	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

Suco natural (fruta ou polpa)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Café ou chás	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 xícara	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Chimarrão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	6 cuias	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Cerveja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 latas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Vinho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 taça	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Cachaça/uísque/vodka	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 dose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

ALIMENTO	FREQUÊNCIA								QUANTIDADE			ÉPOCA	
	OUTROS	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
Castanha, noz, amêndoa ou avelã	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Bauru, cheesburger	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Hamburger ou bife de guisado	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Cachorro quente	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Pizza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Salgados como quibe, pastel, empada	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Alimentos enlatados	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 col sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Pipoca	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 sacos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Chips e salgadinho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pacote	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

Anexo 2 – QFA da coorte de 1993 aplicado aos 15 anos

AGORA VAMOS FALAR SOBRE ALIMENTAÇÃO. O QUE NOS INTERESSA É SABER COMO TEM SIDO TUA ALIMENTAÇÃO DESDE <MÊS DO ANO PASSADO>. 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?															
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
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. Aipim	(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

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
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.															
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
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>	A. Desde <mês do ano passado>, alguma vez comeste?		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
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

Anexo 3 – QFA da Coorte de 1993 aplicado aos 22 anos

Nome: _____ ID: _____

Data entrevista: _____ Entrevistadora: _____

HORA INICIO: ___ h ___ min

VAMOS AGORA PERGUNTAR SOBRE A TUA ALIMENTAÇÃO.

Pensando em UMA SEMANA NORMAL de tuas atividades:						
1. Com que frequência tu tomas o CAFÉ da MANHÃ?	Todos os dias <input type="radio"/>	5-6 X semana <input type="radio"/>	2-4 X semana <input type="radio"/>	1 X semana <input type="radio"/>	1-3x mês <input type="radio"/>	nunca ou quase nunca <input type="radio"/>
2. Com que frequência tu ALMOÇAS?	Todos os dias <input type="radio"/>	5-6 X semana <input type="radio"/>	2-4 X semana <input type="radio"/>	1 X semana <input type="radio"/>	1-3x mês <input type="radio"/>	nunca ou quase nunca <input type="radio"/>
3. Quantas vezes tu ALMOÇAS em RESTAURANTE?	Todos os dias <input type="radio"/>	5-6 X semana <input type="radio"/>	2-4 X semana <input type="radio"/>	1 X semana <input type="radio"/>	1-3x mês <input type="radio"/>	nunca ou quase nunca <input type="radio"/>
4. Quantas vezes TROCAS o ALMOÇO por um LANCHE, como por exemplo sanduíche, pastel, esfirra, cachorro-quente, bauru?	Todos os dias <input type="radio"/>	5-6 X semana <input type="radio"/>	2-4 X semana <input type="radio"/>	1 X semana <input type="radio"/>	1-3x mês <input type="radio"/>	nunca ou quase nunca <input type="radio"/>
5. Com que frequência tu tomas o CAFÉ DA TARDE?	Todos os dias <input type="radio"/>	5-6 X semana <input type="radio"/>	2-4 X semana <input type="radio"/>	1 X semana <input type="radio"/>	1-3x mês <input type="radio"/>	nunca ou quase nunca <input type="radio"/>

6. Com que frequência tu JANTAS?	Todos os dias <input type="radio"/>	5-6 X semana <input type="radio"/>	2-4 X semana <input type="radio"/>	1 X semana <input type="radio"/>	1-3x mês <input type="radio"/>	nunca ou quase nunca <input type="radio"/>
7. Quantas vezes tu jantas em RESTAURANTE?	Todos os dias <input type="radio"/>	5-6 X semana <input type="radio"/>	2-4 X semana <input type="radio"/>	1 X semana <input type="radio"/>	1-3x mês <input type="radio"/>	nunca ou quase nunca <input type="radio"/>
8. Quantas vezes trocas o JANTAR por lanches, como por exemplo sanduíche, bauru ou pizza?	Todos os dias <input type="radio"/>	5-6 X semana <input type="radio"/>	2-4 X semana <input type="radio"/>	1 X semana <input type="radio"/>	1-3x mês <input type="radio"/>	nunca ou quase nunca <input type="radio"/>
9. Com que frequência tu fazes as refeições com a família ou amigos?	Todos os dias <input type="radio"/>	5-6 X semana <input type="radio"/>	2-4 X semana <input type="radio"/>	1 X semana <input type="radio"/>	1-3x mês <input type="radio"/>	nunca ou quase nunca <input type="radio"/>
10. Ajudas a preparar ou preparas algumas das tuas refeições?	<input type="radio"/> NÃO <input type="radio"/> SIM					
11. Tu costumavas ler os rótulos dos alimentos para verificar algum ingrediente?	<input type="radio"/> NÃO <input type="radio"/> SIM					

Agora vamos perguntar uma lista de alimentos e queremos saber se tu consumiste cada um destes alimentos nos **ÚLTIMOS 12 meses**, ou seja, desde _____ (mês) até agora.

- Para cada alimento que eu te perguntar, responde **SE TU CONSUMISTE OU NÃO ESTE ALIMENTO** nos **ÚLTIMOS 12 meses**, de acordo com a seguinte escala de frequência (**MOSTRAR ESCALA**).

- Se consumiste mais de 1 vez por mês, veja as demais opções de frequência mensal, semanal ou diária que representa seu consumo neste últimos 12 meses.

- Para os alimentos que tu me dizeres que CONSUMIU, vou te dar o EXEMPLO de UMA PORÇÃO ou QUANTIDADE deste alimento e quero que tu me digas se tu NORMALMENTE costumavas comer esta quantidade, MENOS ou MAIS.

Vamos começar!

INICIO ENTREVISTA: ____h ____min

ALIMENTO	FREQUÊNCIA								QUANTIDADE			
“COM QUE FREQUÊNCIA TU COMES ...”												
PÃES, BISCOITOS E CEREAIS	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1-3x mês	Nunca ou <1x/mês	PORÇÃO MÉDIA	Menos	Igual	Mais
Pão integral, centeio ou preto (não considerar pão branco)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 fatias de pão de forma ou 1 cacetinho integral	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pão branco: caseiro, de forma, ou cacetinho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 fatias de pão de forma ou 1 cacetinho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Bolacha doce, recheada, ou cookies	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	5 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Bolacha salgada	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	5 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Bolo sem recheio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Granola	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	4 colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Cereais matinais, como sucrilhos, cornflakes, choco krispies, pop	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 xícara média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Barra de cereais	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 barrinha	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
ARROZ, TUBÉRCULOS E MASSAS	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1-3x mês	Nunca ou <1x/mês	PORÇÃO MÉDIA	Menos	Igual	Mais
Arroz branco	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 colheres sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Batata cozida, assada ou purê (incluindo batata doce)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	4 colheres sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Batata, polenta ou aipim FRITOS	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pires	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Miojo, nissin, cup noodles	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pacote ou copo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Lasanha, nhoque, ravióli	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
Massas como macarrão, espaguete, massa parafuso, entre outros	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pegador	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
FEIJÃO, LENTILHA, ERVILHA	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1-3x mês	Nunca ou <1x/mês	PORÇÃO MÉDIA	Menos	Igual	Mais
Feijão (Qualquer cor ou tipo)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 concha média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Lentilha, ervilha e grão de bico	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 concha média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
LEITE E DERIVADOS	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1-3x mês	Nunca ou <1x/mês	PORÇÃO MÉDIA	Menos	Igual	Mais
Leite de vaca (líquido ou pó, qualquer tipo, mesmo que sem lactose)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo médio ou 2 colheres de sopa de pó	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Na maioria das vezes, que tipo de leite tu tomas: [] integral, [] semi ou [] desnatado?												
Na maioria das vezes, tu usas açúcar no leite? [] Não, nada [] Sim									3 colheres de chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<i>Se sim: Pensando em 3 colheres de chá de açúcar, tu usas igual, menos ou mais? → marcar</i>												
Leite de soja (líquido ou pó)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo médio ou 2 colheres de sopa de pó	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
logurte	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo ou 2 potes pequenos ou 1 garrafinha	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Na maioria das vezes, tu tomas o iogurte [] diet, light OU [] normal?												
Queijo branco ou ricota	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia média (30g)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Queijos amarelos em fatia ou ralado, como mussarela, prato ou lanche	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia média (15g) ou 2 colheres de sopa de queijo ralado	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Requeijão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 colher de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
FRUTAS (NÃO considerar sucos)	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1-3x mês	Nunca ou <1x/mês	PORÇÃO MÉDIA	Menos	Igual	Mais
Banana	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 unidades (banana prata)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Mamão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Maçã OU Pêra	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Laranja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
AS PRÓXIMAS FRUTAS SÃO AQUELAS QUE GERALMENTE COMEMOS EM DETERMINADAS ESTAÇÕES DO ANO. RESPONDA A FREQUÊNCIA QUE TU COMES QUANDO É A EPOCA DESSAS FRUTAS:												
Na época da Melancia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Na época da bergamota	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Na época do Melão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Na época do Abacaxi	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 rodela	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Na época do Abacate	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Metade de um abacate	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Na época da Manga	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Metade de uma manga	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Na época do Morango	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	10 morangos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Na época da Uva	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 cacho pequeno	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Na época do Pêssego	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Na época da Goiaba	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
VEGETAIS	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1-3x mês	Nunca ou <1x/mês	PORÇÃO MÉDIA	Menos	Igual	Mais
Alface	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 folha	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Tomate	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	5 rodela	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Couve	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Repolho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Chuchu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Abóbora	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pepino ao natural	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	5 rodela	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Vagem	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Cenoura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Beterraba	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Couve-flor	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pires	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Pimentão (como tempero, em saladas ou outras preparações)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
Cebola (como tempero, em saladas ou outras preparações)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
Alho (como tempero, em saladas ou outras preparações)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
Na maioria das vezes, tu colocas ÓLEOS OU AZEITES nas saladas? [] sim [] não												
<i>Se sim: Qual tipo de óleo? [] óleo de soja [] azeite de oliva extra virgem [] outros azeites</i>												
Na maioria das vezes, tu colocas SAL na salada ou no prato de comida pronto? [] Não, nada [] Sim												
<i>Se sim: Pensando em 1 colher de café (ou um saquinho) de sal, tu usas igual, menos ou mais? → marcar</i>									1 colher de café ou 1 saquinho (1g)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
CARNES E OVOS	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1-3x mês	Nunca ou <1x/mês	PORÇÃO MÉDIA	Menos	Igual	Mais
Carne vermelha, na forma de bife, pedaço, guisado ou outras	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 bife médio ou 4 colheres sopa de guisado	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Na maioria das vezes, tu consumes a carne na forma: [] frita, [] assada/grelhada OU [] cozida ?												
Na maioria das vezes, tu comes a gordura da carne? [] sim [] não												
Carne de porco	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pedaço grande	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1-3x mês	Nunca ou <1x/mês	PORÇÃO MÉDIA	Menos	Igual	Mais
Com qual frequência tu comes as carnes na forma de churrasco?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				

Frango	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 coxa ou sobrecoxa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Qual a forma de preparo do frango que tu mais consumes: [] frito, [] assado/grelhado OU [] cozido?												
Costumas comer a pele do frango? [] sim [] não												
Peixe	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 filé grande	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
NA MAIORIA DAS VEZES, qual a forma de PREPARO DO PEIXE que tu mais consumes: [] frito, [] assado/grelhado OU [] cozido [] cru ?												
Camarão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pires	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Peixe enlatado como sardinha e atum	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
Miúdos, como moela, fígado, coração, rim ou outros	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 bife de fígado ou 3 colheres de sopa de miúdos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Hamburguer industrializado OU Nuggets	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 hambúrguer ou 2 nuggets	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Salsicha	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 unidade média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Linguiça ou salsichão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 salsichão ou 4 rodelas de linguiça	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Mortadela, presunto, salame	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Bacon ou toucinho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pedaço	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Ovos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 ovo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Na maioria das vezes, tu consumes o OVO: [] frito OU [] cozido?												

MANTEIGA E MAIONESE	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1-3x mês	Nunca ou <1x/mês
Margarina	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Manteiga	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Maionese (qualquer tipo)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

DOCES	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1-3x mês	Nunca ou <1x/mês	PORÇÃO MÉDIA	Menos	Igual	Mais
Sorvete OU picolé, no verão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 bolas de sorvete ou 1 picolé	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Balas OU pirulito	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	4 unidades ou 2 pirulitos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Doce à base de leite, como doce de leite, e pudins	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 colheres de sopa ou 1 fatia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Doces à base de frutas, como geleias, goiabada	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Chocolate em pó ou Nescau	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 colheres de sopa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Chocolate em barra ou bombom	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 barra pequena ou 1 bombom	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

BEBIDAS	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1-3x mês	Nunca ou <1x/mês	PORÇÃO MÉDIA	Menos	Igual	Mais
Refrigerantes de coloração preta, como Coca-cola, Pepsi-cola, Fruki-Cola	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo pequeno	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Outros refrigerantes: Guaraná, Limão, Laranja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo pequeno	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Qual tipo de refrigerante que tu mais consumes: [] Diet/Light ou [] Normal ?												
Suco em pó ou de caixa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo pequeno	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1-3x mês	Nunca ou <1x/mês	PORÇÃO MÉDIA	Menos	Igual	Mais
Suco natural feito com frutas, polpas ou vegetais (NÃO considerar sucos de caixa ou garrafa)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 copo pequeno	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Geralmente, usas açúcar no suco? [] Não, nada [] Sim <i>Se sim: Pensando em 3 colheres de chá, tu usas igual, menos ou mais? -> (marcar)</i>									3 colheres de chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1-3x mês	Nunca ou <1x/mês	PORÇÃO MÉDIA	Menos	Igual	Mais
Café	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 xícara média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Geralmente, usas açúcar no café? [] Não, nada [] Sim: <i>(marque a qtd->)</i>									3 colheres de chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 xícara média	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Geralmente, usas açúcar no chá? [] Não, nada [] Sim <i>Se sim: Pensando em 3 colheres de chá, tu usas igual, menos ou mais? -> (marcar)</i>									3 colheres de chá	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Chimarrão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				

Cerveja ou Chopp	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	2 latas de cerveja ou 2 copos de <i>chopp</i>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Vinho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 taça	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Cachaça/uísque/vodka, drinks ou batidas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 dose ou 1 drink	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

ALIMENTOS DIVERSOS	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1-3x mês	Nunca ou <1x/mês	PORÇÃO MÉDIA	Menos	Igual	Mais
Chips e salgadinho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 pacote pequeno de salgadinho	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pizza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	1 fatia de pizza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Bauru, cheesburger OU cachorro quente	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1-3x mês	Nunca ou <1x/mês	PORÇÃO MÉDIA	Menos	Igual	Mais
Salgados como quibe, pastel, empada, esfirra, coxinha de galinha	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
Pipoca doce ou salgada	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
Alimentos em conserva, como ervilha, milho, pepino ou picles	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
Amendoim, castanha, noz, amêndoa ou avelã	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	3 unidades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

ADOÇANTES E PIMENTA	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1-3x mês	Nunca ou <1x/mês	
Com que frequência tu comes comidas apimentadas ou usas pimenta para temperar?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<i>>>>Se consome até 1-3x no mês:</i>									
Quando tu consumes comida temperada, qual o tipo de pimenta que tu mais usas?	<input type="radio"/> molho de pimenta	<input type="radio"/> pimenta fresca (qualquer tipo ou cor)	<input type="radio"/> óleos apimentados	<input type="radio"/> pimenta em conserva	<input type="radio"/> pimenta comprada moída	<input type="radio"/> pimenta desidratada (qualquer tipo ou cor)	<input type="radio"/> outro tipo	<input type="radio"/> não sei informar	
Com que frequência tu usas adoçantes artificiais?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Quando usas o adoçante, qual a forma que geralmente usas [marque somente uma alternativa abaixo]:									
<input type="radio"/> gotas: se sim, Quantas? ___ __ <input type="radio"/> esguicho: se sim, Quantos? ___ __ <input type="radio"/> envelope: se sim, Quantos? ___ __ <input type="radio"/> colheres: se sim, Quantos? ___ __									
Qual o nome do adoçante que tu mais usas:									

Nos últimos 12 meses, fizeste alguma coisa para perder ou ganhar peso?

- Não
- Sim, para perder -> *Se sim, abre a questão A*
- Sim, para ganhar -> *Se não, abre a questão B*

A - O que fizeste para perder peso?

Tomaste remédio: Sim Não

Fizeste dieta/regime: Sim Não

Fizeste exercícios ou esporte Sim Não

Tomaste algum tipo de chá: Sim Não

Outra: _____

B - O que fizeste para ganhar peso?

Tomaste remédio: Sim Não

Fizeste dieta/regime: Sim Não

Fizeste exercícios ou esporte Sim Não

Tomaste algum tipo de chá: Sim Não

Outra: _____

Considerando que **suplementos alimentares** são preparações destinadas a complementar a alimentação e fornecer, por exemplo, **vitaminas, minerais, fibras, proteínas, carboidratos ou gorduras**. Gostaríamos de saber se:

Nos últimos 12 meses, usaste algum tipo de suplemento? [] Sim [] Não

---Se sim:

Quantos: __ __ [digitar o número; só aceitar até o número 10] [abre o espaço de preenchimento a seguir, de acordo com a resposta anterior]								
Qual o tipo ou nome comercial e indique a frequência que tu tens usado cada um:								
<i>[linhas ficam em aberto para serem preenchidos pelo entrevistado]</i>	1x dia	2-4x dia	≥5x dia	1x semana	2-4x semana	5-6x semana	1-3x mês	<1x/mês
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

OBRIGADA PELA SUA COLABORACAO!

HORA DE TERMINO: __h __ m

ALTERAÇÕES DO PROJETO DE PESQUISA

Algumas modificações foram realizadas no projeto original, as quais estão descritas a seguir.

1) Artigo de revisão: Fatores dietéticos e saúde óssea: revisão sistemática da literatura

Durante a defesa do projeto foi comentado por ambos membros da banca sobre possíveis dificuldades para a confecção deste artigo, uma vez que a literatura sobre o tema, além de ampla, aborda de formas metodologicamente distintas o consumo alimentar, dificultando a sistematização dos dados. Mesmo assim, foi considerado que uma possível concretização deste artigo poderia ser realizada através de uma revisão sobre padrões alimentares e saúde óssea. No entanto, foi publicado em 2017 o artigo “*Current Evidence on the Association of Dietary Patterns and Bone Health: A Scoping Review*” na revista da *American Society for Nutrition*. Como alternativa, optou-se pela realização de um artigo original, cujo título é “*Associations between body mass index, lean and fat mass and bone density in young adults: Findings from a Southern Brazilian Cohort*”.

2) Artigo original 1: Persistência da lactase e massa óssea: análise de randomização mendeliana na coorte de 1982 de Pelotas, Brasil

Análises preliminares indicaram uma associação fraca entre o consumo de leite e o SNP rs4988235 (considerado variável instrumental, potencial proxy genético do consumo de leite), o que talvez pudesse inviabilizar a concretização deste artigo. Acrescido a isto, também em 2017, foi publicado no *International Journal of Epidemiology* um artigo com a mesma temática, denominado “*Genetically predicted milk consumption and bone health, ischemic heart disease and type 2 diabetes: a Mendelian randomization study*”, com uma amostra substancialmente superior ($n = 102\ 750$) a da coorte de 1982. Desta forma, optou-se por propor um artigo sobre crescimento condicional (peso e comprimento/altura) e massa mineral óssea, com título provisório “*Growth across life course and bone mineral density at 22 years of age: the 1993 Pelotas birth cohort*”.

Observação: o artigo original 2, “Determinantes dietéticos da massa óssea aos 22 anos de idade: análise prospectiva da coorte de nascimentos de 1993 de Pelotas, Brasil”, foi mantido, tendo como título “*Milk consumption, dietary calcium intake and nutrient patterns from adolescence to early adulthood and its effect on bone mass: the 1993 Pelotas Birth Cohort, Brazil*”.

3) Ordem dos artigos

O primeiro artigo realizado foi aquele inicialmente considerado artigo original 2 (*Milk consumption, dietary calcium intake and nutrient patterns from adolescence to early adulthood and its effect on bone mass: the 1993 Pelotas Birth Cohort, Brazil*), seguido pelo artigo intitulado “*Associations between body mass index, lean and fat mass and bone density in young adults: Findings from a Southern Brazilian Cohort*” e, por fim, pelo artigo “*Growth across life course and bone mineral density at 22 years of age: the 1993 Pelotas birth cohort*”.

ARTIGOS

Artigo 1

Milk consumption, calcium intake and nutrient patterns from adolescence to adulthood and its effect on bone mass: The 1993 Pelotas Birth Cohort, Brazil

Aceito na Revista Cadernos de Saúde Pública

Normas: <http://cadernos.ensp.fiocruz.br/csp/submissao/instrucao-para-autores>

Milk consumption, calcium intake and nutrient patterns from adolescence to adulthood and its effect on bone mass: The 1993 Pelotas Birth Cohort, Brazil

Milk, calcium, nutrient patterns and bone mass

Isabel Oliveira Bierhals^{1*}

E-mail: isabelbierhals@gmail.com

Juliana dos Santos Vaz²

E-mail: juliana.vaz@gmail.com

Ana Maria Baptista Menezes²

E-mail: anamene.epi@gmail.com

Fernando César Wehrmeister²

E-mail: fcwehrmeister@gmail.com

Leonardo Pozza²

E-mail: leonardo_pozza@yahoo.com.br

Maria Cecília Formoso Assunção²

E-mail: cecilia.epi@gmail.com

¹ MSc. Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas - RS, Brazil.

² PhD. Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas - RS, Brazil.

***Corresponding author:** Rua Marechal Deodoro, 1160 – 3º andar, Pelotas/RS, 96020-220, Brazil. Phone: + 55-53-32841300.

E-mail: isabelbierhals@gmail.com

Abstract

The objective of this study is to evaluate the effect of milk consumption, dietary calcium intake and nutrient patterns (bone-friendly and unfriendly patterns) from late adolescence to early adulthood, on bone at 22 years of age. Cross-sectional analyzes was performed with 3,109 participants from 1993 Pelotas Birth Cohort in the follow-ups of 18 and 22 years of age. Bone mineral density of the lumbar spine, right femur and whole body were assessed at 22 years using a dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). The exposure variables (dietary calcium, milk and nutrient patterns) were created by combining the consumption frequencies between the two follow-ups (always low, moderate, high, increase or decrease). Multiple linear regressions were performed, stratified by sex. In right femur site, men classified into the “always high” (mean: 1.148 g/cm²; 95%CI: 1.116; 1.181) and “increased” categories of milk consumption (mean: 1.154 g/cm²; 95%CI: 1.135; 1.174) presented a slightly low BMD comparing with low (mean: 1.190 g/cm²; 95%CI: 1.165; 1.215) and moderate (mean: 1.191 g/cm²; 95%CI: 1.171; 1.210) categories. In addition, men always classified in the highest tertile of the “bone-unfriendly” pattern presented the lowest mean of whole body BMD (mean: 1.254 g/cm²; 95%CI: 1.243; 1.266). No associations were observed between the categories of dietary calcium intake and “bone-friendly” pattern and each of the three BMD outcomes. These results point to the fact that diets composed of inhibiting foods/nutrients can contribute negatively to bone health.

Keywords: Bone density; Absorptiometry, Photon; Milk; Calcium, Dietary; Principal Component Analysis.

Introduction

Bones are considered the main reservoir of calcium in the human body and maintain 99% of total body calcium¹. Calcium is mainly stored in the form of hydroxyapatite and it provides bone stiffness and minimizes the risk of fractures². During childhood and adolescence, anabolic processes predominate in the bone, which leads to increased size and mineral content and results in the individual's growth. Approximately 90% of peak bone mass (PBM) – the maximum amount of bone mass that an individual accumulates from birth to skeletal maturity – is

obtained up to the age of 20 years. However, it may vary between individuals and the skeletal regions^{3, 4}.

The accumulation and maintenance of bone mineral mass, usually assessed through bone mineral content (BMC) and density (BMD), is a multifactorial process, influenced by age, sex, heredity and by potentially modifiable life behaviors⁵⁻⁷. Genetic factors account for approximately 70% of the variance in bone mass⁸. Male subjects have higher bone mass than female, as well black subjects, comparing with white non-Hispanic or Asian⁶. Several hormones affect bone mass. Estrogen plays an important part in maintaining BMD in women. Testosterone, growth hormone, and IGF-1 all promote bone formation, whereas glucocorticoid excess both increases bone resorption and impairs bone formation⁶.

Physical activity, especially mechanical loading during weight-bearing exercise improves bone mineral accrual in children and adolescents⁹. Maintenance of a healthy body weight during childhood and adolescence is also recommended to optimize bone health⁶. In addition, many of the foods and nutrients people eat as part of their daily diet may have a positive or negative impact on bone health^{5, 6}. Diet factors supporting the development and maintenance of bone mass include calcium, vitamin D, protein, potassium, among others. Factors such as oxalic acid, phytic acid, sodium, caffeine and, particularly, the excess of those, can potentially interfere with absorption and retention of calcium and thereby have a negative effect^{5, 10}.

Milk and dairy products in general are the best sources of calcium in the diet and also provide more protein, magnesium, potassium, zinc and phosphorus – all of which important for bone health as well – than any other food^{11, 12}. However, there is still debate on the effect of calcium dietary intake as well as milk and its derivatives on the acquisition of bone mass in the different phases of life. For example, the effect of breastfeeding is not consistent among studies¹³⁻¹⁵, and few of them indicate that it exerts a protective effect on bone health^{14, 15}. Concerning childhood, the literature is more consistent about the protective effect of calcium from dairy products on bone mineral mass¹⁶⁻²¹. Two meta-analyses confirmed a beneficial impact on bone mineral accumulation at this stage of growth^{22, 23}. As for adolescence, studies have shown that the protective effect is not so clear and does not occur equally among boys and girls²⁴⁻²⁶, whereas in

adulthood there is no evidence that consumption of dietary calcium and dairy products helps to reduce the risk of osteoporosis and future bone fractures²⁷⁻³⁰.

In addition to examining potential relationships between dietary intake and bone quality through the individual effect of nutrients or foods³¹, analyses of dietary patterns have been used to elucidate possible associations between the combined intake of a set of foods or nutrients and bone health³¹⁻³³. This type of analysis assesses the subjects' general tendencies to consume more often certain types of food and meals, rather than a single food or nutrient, thus making it possible to test the intercorrelation among them³³.

Our study aimed to evaluate the effect of dietary calcium intake, milk consumption and dietary patterns generated from nutrients that act as facilitators ("bone-friendly") or inhibitors of calcium absorption ("bone-unfriendly") from late adolescence to early adulthood, on BMD at 22 years of age. The study used data from a birth cohort study conducted in the city of Pelotas, in southern Brazil.

Materials and methods

1993 Pelotas Birth Cohort Study

The 1993 Pelotas Cohort study recruited all hospital births from mothers living in the urban area of Pelotas, in southern Brazil, between 1st January and 31st December 1993³⁴. In 1993, there were a total of 5,265 live births, and 5,249 pairs mother-baby agreed to participate. Detailed information on the cohort methodology has been reported elsewhere³⁴⁻³⁶.

The present study used data from the follow-ups at 18 and 22 years. The sample comprised individuals with information available on diet and bone mass at both follow-ups.

Diet assessment

A semi-qualitative food frequency questionnaire (FFQ)³⁷, administered through an electronic platform, assessed dietary consumption at 18 and 22 years. The FFQ comprised 88 food items and eight frequency options were given: (i) never or fewer than once per month; (ii) one to three times per month; (iii) once per week; (iv) two to four times per week; (v) five to six times per week; (vi) once per day; (vii) two to four times per day; and (viii) five or more times per day. The

participants were requested to report their intake referring to the preceding 12 months. Daily energy intake in kilocalories and nutrient intake were estimated using the Brazilian Food Composition Table³⁸, supplemented with food and nutrient items from other sources³⁹⁻⁴¹.

Milk consumption

For the analyses, the frequencies of milk consumption obtained at both follow-ups were categorized into five consumption categories: “always high” (corresponding to the two highest categories of consumption: “two to four times per day” or “five or more times per day” at 18 and at 22 years), “always moderate” (accounting for four intermediate categories at both follow-ups: “once per week”; “two to four times per week”; “five to six times per week”; or “once per day”), “always low” (corresponding to the two lowest consumption categories: “never or fewer than once per month” or “one to three times per month” at both follow-ups), “increase” (accounting for any increase in the frequency of consumption observed at the two follow-ups) and “decrease” (for any decrease in the frequency of consumption at the two follow-ups).

We opted for the non-inclusion of dairy consumption in the analysis related to the effect of milk intake on bone mass. This decision was due to the fact that the food data collected showed that the daily intake of calcium from cheese and yogurt represented 8.6% and 14.0% at 18 years, respectively, and 11.1% and 5.9% at 22 years of total ingested calcium (data not shown), confirming its low consumption in the study population. On the other hand, milk was the food that contributed the most to the dietary calcium intake at 18 years of age, representing 28.2% of the daily calcium consumed and 22.5% at 22 years. However, the contribution of these foods was considered in the analysis concerning the effect of calcium consumption.

Dietary calcium intake

Data on calcium intake was determined by adding up the availability of calcium in all foods listed in the FFQ. The continuous calcium variable was categorized into tertiles to produce similar categories to those formed for milk: “always high” (corresponding to the highest tertile of consumption at 18 and at 22 years), “always moderate” (corresponding to the intermediate tertiles at both

follow-ups), “always low” (corresponding to the lowest tertiles of calcium intake at the two follow-ups), “increase” (accounting for any increase in the tertiles of calcium intake observed at the two follow-ups) and “decrease” (for any decrease in tertiles of calcium at the two follow-ups).

Nutrient patterns

Nutrient patterns were constructed from seven nutrients - phytate, oxalate, protein, calcium, vitamin D, sodium and caffeine, as those nutrients affecting calcium absorption^{5, 10}. Principal component analysis (PCA) and rotation were applied to derive the patterns, which allowed the food groups to be combined based on the degree of intercorrelation between them. A correlation matrix was constructed to assess the correlation between the food groups. The Kaiser-Meyer-Olkin test (≥ 0.8) and Bartlett’s test of sphericity (p-value < 0.05) were applied to verify whether the PCA assumptions would be met^{42, 43}. Factorial analysis without restriction was conducted on the number of factors to be retained by using a varimax orthogonal rotation in order to obtain uncorrelated patterns and improve the interpretation of the data. Food groups that showed factor loadings $\geq |0.4|$ were considered to have strong associations with that factor.

The number of components to be extracted was defined based on the eigenvalue criteria greater than one and on the scree plot graphic, in which the points of greatest slope indicate the number of factors to be considered in the analysis⁴⁴. After that, the model was constructed by fixing the number of patterns to be retained in accordance with the number indicated by the graph. Nutrient patterns were named according to the nutrient’s items included and their interpretation. The participants received a factor score for each nutrient pattern identified⁴⁵.

Each pattern score was categorized into tertiles to produce the same five categories: “always high” (corresponding to the third tertile of consumption at 18 and at 22 years), “always moderate” (corresponding to the intermediate tertile at both follow-ups), “always low” (corresponding to the first tertile of nutrient patterns at the two follow-ups), “increase” (accounting for any increase in the tertiles of nutrient patterns observed at the two follow-ups) and “decrease” (for any decrease in tertiles of patterns at the two follow-ups).

Bone mass assessment

Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) (Lunar Prodigy Advance – GE®) was used to assess areal Bone Mineral Density (aBMD) (g/cm²) of the lumbar spine (L1-L4), the right femur and whole body at 22 years. These variables were analyzed continuously. The participants that did not undergo the DXA tests included those who were pregnant or possibly pregnant, those who were wheelchair users or individuals with osteoarticular deformities, and those who were morbidly obese (> 120 kg) or taller than 192 cm. Individuals that were over 192 cm tall did not undergo BMD whole body measurement, but had their lumbar spine and femur scanned.

Potential confounders

Variables considered as potential confounding factors in the association between milk consumption and bone mass, collected at the perinatal interview, were applied in the adjusted analysis, and include: family income at birth (in Brazilian Reals); maternal education (years of study); birth weight (grams); length at birth (centimeters). This adjustment also encompassed the variables collected at 15 years (self-reported skin color) and at 18 years: smoking (at least one cigarette per day during the month leading up to interview), moderate and vigorous physical activity (using the leisure-time and commuting sections from the International Physical Activity Questionnaire – IPAQ long version⁴⁶. Leisure-time and commuting activities were classified as moderate and vigorous intensity as proposed by Pate et al.⁴⁷), total calorie intake and soft drink consumption (kcal) and finally at 22 years of age: height (centimeters).

Statistical analyses

All statistical analyses were carried out by using the statistical package Stata 12.1® (Stata Corp., College Station, Texas, USA) and stratified by sex, given that evidences suggested the existence of gender differences in bone mass at different phases of life^{48, 49}. A descriptive analysis was performed, and it included a description of absolute and relative frequencies for categorical variables, and mean and standard deviation (SD) or median and interquartile range (p25-p75) for numeric variables.

In order to assess the effects of milk consumption, dietary calcium intake and nutrient patterns from 18 to 22 years of age on bone mass at 22 years, means, 95% confidence intervals (95% CI), adjusted R squared (R^2) and p-values from the Wald test for heterogeneity were obtained by multiple linear regression, with statistical significance at $p < 0.05$. In the adjusted models, all the potential confounders were included in the regression, irrespective of their level of significance with the outcome on bivariate analysis. Variance inflation factor was used to assess the presence of collinearity in the tested models.

Ethics statement

All the follow-ups of the 1993 Pelotas Birth Cohort Study were approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Pelotas Medical School under permit number 1.250.366. At all stages, the participants (or their legal guardians) signed an informed consent form.

Results

Study participants

The follow-up retention rate at 18 years was 81.3% relative to the original cohort, with data collected from 4,106 participants. At 22 years, 3,810 individuals (follow-up retention rate of 76.3%) were interviewed^{35, 36}. Out of the total number of participants assessed at those two moments, data on milk consumption and bone mineral mass were available for 3,109 and comprised the sample for the present study. In this group, 1,653 (53.2%) were female. Table 1 shows the differences between the participants included in and those excluded from the current analysis. For both sexes, there were differences regarding birth weight and smoking at 18 years. Among males, a higher percentage of excluded individuals came from families with an income at birth ≤ 1 monthly minimum wage (MMW) and those taller at 22 years. Among women, a higher percentage of included participants had mothers with 5 to 11 years of schooling when compared with those women excluded from the current analysis and regarding to gestational age, the percentage of those born at 37-40 weeks was greater among excluded women.

Bone mass at 22 years of age

Table 1 also shows the mean of the outcomes at 22 years of age among participants included and excluded from the current analysis. Only the whole body BMD for males was slightly higher among those included as compared to those excluded (1.3 vs. 1.2 g/cm²; p=0.033). The whole body BMD mean among the included women was 1.2 g/cm². For lumbar spine BMD, the mean was 1.2 g/cm² among men and women, while for right femur BMD, it was 1.2 for men and 1.0 g/cm² for women.

Milk consumption and bone mass

Table 2 shows the adjusted analyses and R² of the associations between milk consumption and BMD. In right femur site (R²: 8.44), men classified into the “always high” (mean: 1.148 g/cm²; 95%CI: 1.116; 1.181) and “increased” categories of milk consumption (mean: 1.154 g/cm²; 95%CI: 1.135; 1.174) presented a slightly low BMD comparing with low (mean: 1.190 g/cm²; 95%CI: 1.165; 1.215) and moderate (mean: 1.191 g/cm²; 95%CI: 1.171; 1.210) categories (p=0.024). No associations were observed for women’ right femur BMD neither for whole body nor lumbar spine BMD and milk consumption in both sexes.

Dietary calcium intake and bone mass

Table 3 shows the adjusted analyses and R² of the association between calcium dietary intake and BMD at 22 years of age. No associations were observed between the categories of dietary calcium intake and each of the three BMD outcomes (whole body, lumbar spine and right femur) in both sexes.

Nutrient patterns and bone mass

Two nutrient patterns were identified, which explained 81.8% of the total variability of data. The KMO value was 0.82, and the Bartlett test was <0.001 at both ages, which indicated good factorial adjustment. The patterns were named based on the characteristics of the items held in each pattern (bone-friendly pattern and bone-unfriendly pattern). The so-called “bone-friendly” pattern was characterized by the consumption of oxalate, protein, calcium and sodium. The

“bone-unfriendly” pattern was characterized by the consumption of caffeine and a negative loading on vitamin D (Supplementary Table 1).

In both men and women, the “bone-friendly” pattern was not associated to any of the three BMD outcomes (whole body, lumbar spine and right femur) (Table 4). On the other hand, men always classified in the highest tertile of the “bone-unfriendly” pattern presented the lowest mean of whole body BMD (mean: 1.254 g/cm²; 95%CI: 1.243; 1.266; R²: 12.20) (p=0.015) (Table 5).

Discussion

The present study aimed to investigate the role of milk consumption, dietary calcium and nutrient patterns (“bone-friendly” and “bone-unfriendly”), from late adolescence to early adulthood, on BMD at 22 years of age. Associations were observed for milk consumption and “bone-unfriendly” pattern with slightly differences in whole body and right femur BMD only among men.

One aspect that may support the lack of association is the low calcium intake in the population studied. At the age of 18, only 25.0% of the respondents met the daily Estimated Average Requirements (EAR) of the mineral (1,100 mg per day) and, at the age of 22, 42.0% (800 mg per day)⁵⁰. Another aspect that may be influencing the absence of associations are the small differences in BMD between the exposure groups.

Most of the evidence reported in the scientific literature regarding the effect of dietary calcium intake on BMD derives from randomized clinical trials conducted from drug supplementation^{30, 51, 52}. This is certainly due to the fact that studies involving food interventions are difficult to perform within the time required and have high costs⁵³. Thus, evaluations of the effect of dietary calcium on bone come from observational studies^{24, 54-57}, which are more complex, especially in the measurement of food consumption. Results of such studies are still inconsistent about the beneficial effects among the different age groups, retaining doubts. In our study, only 105 subjects (3.38% of the total sample) reported the use of dietary supplements, such as multivitamins, which may contain calcium and/or vitamin D. We repeated the analyses, firstly with and then without these individuals, and we did not observe changes in the magnitude or direction of the associations.

Dietary guidelines indicate the consumption of milk and dairy products as the best sources of calcium and, consequently, as beneficial for bone health⁵⁸⁻⁶⁰. The present study observed that those men with higher milk consumption presented a slightly lower BMD. However, this finding must be interpreted with caution. Two meta-analyses evaluated milk intake and its effect on bone mass in adults^{27, 28} and did not find any effect. Also, a recent Mendelian randomization evaluated the effect of milk consumption on bone mass, specifically on BMD, on a genetic variant related to the persistence of lactase (rs4988235), and found no association either⁶¹.

Another approach used in the present study was to identify food patterns that were characterized by nutrients that act as facilitators or inhibitors of calcium absorption, which hypothesized it would lead to a positive or negative effect on bone health. In contrast to the patterns obtained from foods, the patterns obtained from nutrients can characterize specific nutritional profiles allowing comparisons in the populations. This approach is particularly useful for identifying nutrient combinations that may reflect possible biological mechanisms⁶². By expressing the combined and potentially synergistic effects of the various foods/nutrients consumed in the usual diet of a given population, the World Health Organization recommends that the assessment of dietary intake in population studies be based on dietary patterns⁶³.

For the “bone-friendly” pattern, associations were not found. For the bone-unfriendly pattern, we observed that men who were classified into the highest score in this pattern, e.g. high in caffeine and a negative loading on vitamin D, presented a lower BMD in comparison with the other categories. Studies with conventional approaches on dietary patterns have identified that adherence to “healthy” dietary patterns characterized by consumption of fish, olive oil, fruit and vegetables and low consumption of red meat and sweets have been positively associated with BMD and risk reduction of fractures in different populations⁶⁴⁻⁶⁹. On the other hand, the so-called Western patterns, rich in fats and oils, meats and processed meats, are negatively associated⁶⁵.

It is important to mention that the method of deriving nutrient patterns in this study, referred to “a posteriori approach”, through statistical methods of reduction and/or aggregation of components, provides specific patterns of the study’s population and may not be reflected in others. However, this method has

the advantage of reflecting the real behavior of a population group, providing useful information for the creation of nutritional guidelines⁷⁰.

The strengths of the present study include: the BMD measurements obtained by DXA, a method considered as gold standard for assessing bone mass; high rate of follow-up; possibility of evaluating the association between dietary intake at different ages and BMD adjusted for potential confounders, such as maternal characteristics collected at birth; and prospective analysis of the exposure.

The main limitation of this study is the retrospective methodology of estimating food consumption, related to the potential memory bias, which may interfere with the usual dietary estimation and the possibility of underestimation or overestimation of consumption^{71, 72}. Nevertheless, the acquisition of dietary data was performed under the supervision of a team previously trained to clarify doubts in the digital platform. This led to quick data entry, which facilitated the consistency analyses, eliminated the need for double data entry, and shortened the time needed for data collection³⁷. Another limitation is the fact that we did not have the measure of serum vitamin D, which is essential for the intestinal absorption of calcium, through the active transport of this nutrient from the lumen of the duodenum to the blood, thus guaranteeing its availability in the body⁷³. Yet, the absence of adjustment for sexual maturation also needs to be reported, as well as for impact physical activity variables, which may interfere with bone mass. However, at the 18-year most of the adolescents were expected to have completed the sexual maturation, as menarche age is 12.34 years (95%CI: 12.24; 12.42) (data not shown), and, in boys, studies show that voice breaking age is 13 years and Tanner Genital Stage 5 between 14 and 15 years of age^{74, 75}. About physical activity, the use of IPAQ (valid for epidemiological studies⁴⁶) may have minimized this limitation.

Conclusions

In conclusion, despite the low milk consumption and dietary calcium in our population, which could have prevented us from finding a positive effect of calcium on BMD, our results did not show the lower consumers at a higher risk for low bone density. As for the dietary patterns, which make it possible to evaluate individuals' nutrition more comprehensively, we observed that diets

composed of inhibiting foods/nutrients can contribute negatively to bone health. Further studies are necessary to elucidate this relationship.

References

1. Ward K. Musculoskeletal phenotype through the life course: the role of nutrition. *Proc Nutr Soc.* 2012;71(1):27-37.
2. Aloia J, Bojadziewski T, Yusupov E, Shahzad G, Pollack S, Mikhail M, et al. The relative influence of calcium intake and vitamin D status on serum parathyroid hormone and bone turnover biomarkers in a double-blind, placebo-controlled parallel group, longitudinal factorial design. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;96(7):3216-24.
3. Bachrach LK. Acquisition of optimal bone mass in childhood and adolescence. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12(1):22–8.
4. Mora S, Gilsanz V. Establishment of peak bone mass. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2003;32(1):39-63.
5. Cashman KD. Diet, Nutrition, and Bone Health. *J Nutr.* 2007;137:2507S–12S.
6. Golden NH, Abrams SA. Optimizing Bone Health in Children and Adolescents. *Pediatrics.* 2014;134(4):e1229-e43.
7. Rizzoli R. Nutrition: its role in bone health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008;22(5):813–29.
8. 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.
9. Hind K, Burrows M. Weight-bearing exercise and bone mineral accrual in children and adolescents: a review of controlled trials. *Bone.* 2007;40(1):14-27.
10. Mangels AR. Bone nutrients for vegetarians. *Am J Clin Nutr* 2014;100 (Sup 1):469S-75S
11. Caroli A, Poli A, Ricotta D, Banfi G, Cocchi D. Invited review: dairy intake and bone health: a viewpoint from the state of the art. *J Dairy Sci.* 2011;94(11):5249-62.
12. Heaney RP. Calcium, dairy products and osteoporosis. *J Am Coll Nutr.* 2000;19(2 Suppl):83S-99S.
13. Muniz LC, Menezes AMB, Assunção MCF, Wehrmeister FC, Martínez-Mesa J, Gonçalves H, et al. Breastfeeding and bone mass at the ages of 18 and 30: Prospective analysis of live births from the Pelotas (Brazil) 1982 and 1993 Cohorts. *PLoS ONE* 2015;10(4):e0122759.

14. 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(5):1605-11.
15. 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.
16. Rizzoli R, Bianchi ML, Garabedian M, McKay HA, Moreno LA. Maximizing bone mineral mass gain during growth for the prevention of fractures in the adolescents and the elderly. *Bone.* 2010;46(2):294–305.
17. Rizzoli R. Dairy products, yogurts, and bone health. *Am J Clin Nutr.* 2014;99(suppl):1256S–62S.
18. Black RE, Williams SM, Jones IE, Goulding A. Children who avoid drinking cow milk have low dietary calcium intakes and poor bone health. *Am J Clin Nutr* 2002;76:675-80.
19. Bounds W, Skinner J, Carruth BR, Ziegler P. The relationship of dietary and lifestyle factors to bone mineral indexes in children. *J Am Diet Assoc.* 2005;105(5):735-41.
20. Infante D, Tormo R. Risk of inadequate bone mineralization in diseases involving long-term suppression of dairy products. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30(3):310-3.
21. Rockell JE, Williams SM, Taylor RW, Grant AM, Jones IE, Goulding A. Two-year changes in bone and body composition in young children with a history of prolonged milk avoidance. *Osteoporos Int.* 2005;16(9):1016-23.
22. Huncharek M, Muscat J, Kupelnick B. Impact of dairy products and dietary calcium on bone-mineral content in children: results of a meta-analysis. *Bone.* 2008;43(2):312–21.
23. Winzenberg T, Shaw K, Fryer J, Jones G. Effects of calcium supplementation on bone density in healthy children: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ.* 2006;333(775):1-6.
24. Mouratidou T, Vicente-Rodriguez G, Gracia-Marco L, Huybrechts I, Sioen I, Widhalm K, et al. Associations of Dietary Calcium, Vitamin D, Milk Intakes, and 25-Hydroxyvitamin D With Bone Mass in Spanish Adolescents: The HELENA Study. *Journal of Clinical Densitometry: Assessment of Skeletal Health.* 2013;16(1):110-7.

25. Vatanparast H, Baxter-Jones A, Faulkner RA, Bailey DA, Whiting SJ. Positive effects of vegetable and fruit consumption and calcium intake on bone mineral accrual in boys during growth from childhood to adolescence: the University of Saskatchewan Pediatric Bone Mineral Accrual Study. *Am J Clin Nutr* 2005;82(3):700-6.
26. Whiting SJ, Vatanparast H, Baxter-Jones A, Faulkner RA, Mirwald R, Bailey DA. Factors that affect bone mineral accrual in the adolescent growth spurt. *J Nutr* 2004;134(4):696S-700S.
27. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Baron JA, Kanis JA, Orav EJ, Staehelin HB, et al. Milk intake and risk of hip fracture in men and women: a meta-analysis of prospective cohort studies. *J Bone Miner Res*. 2011;26(4):833–9
28. Kanis JA, Johansson H, Oden A, De Laet C, Johnell O, Eisman JA, et al. A meta-analysis of milk intake and fracture risk: low utility for case finding. *Osteoporos Int* 2005;16(7):799-804
29. Bolland MJ, Leung W, Tai V, Bastin S, Gamble GD, Grey A, et al. Calcium intake and risk of fracture: systematic review. *BMJ*. 2015;351:h4580.
30. Tai V, Leung W, Grey A, Reid IR, Bolland MJ. Calcium intake and bone mineral density: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2015;351:h4183.
31. Kontogianni MD, Yiannakouris N. Diet and bone health – the perspective of dietary pattern analysis. *Eur Musculoskelet Rev*. 2009;4(1):73–4.
32. Rizzoli R, Bonjour JP, Chevalley T. Dietary protein and bone mass accrual. In: *Nutritional Influences on Bone Health*, pp. 1–8 [P Burckhardt, B Dawson-Hughes and C Weaver, editors]. London: Springer-Verlag. 2010.
33. Monjardino T, Lucas R, Ramos E, Barros H. Associations between a priori-defined dietary patterns and longitudinal changes in bone mineral density in adolescents. *Public Health Nutr*. 2014;17(1):195-205.
34. Victora CG, Hallal PC, Araújo CLP, Menezes AMB, Wells JCK, Barros FC. Cohort profile: the 1993 Pelotas (Brazil) birth cohort study. *Int J Epidemiol* 2008;37:704-9.
35. Gonçalves H, Assunção MCF, Wehrmeister FC, Oliveira IO, Barros FC, Victora CG, et al. Cohort Profile update: The 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort follow-up visits in adolescence. *Int J Epidemiol* 2014:1-7.

36. Gonçalves H, Wehrmeister FC, Assunção MCF, Tovo-Rodrigues L, Oliveira IO, Murray J, et al. Cohort Profile Update: The 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort follow-up at 22 years. *Int J Epidemiol*. 2017;1-7.
37. Schneider BC, Motta JVS, Muniz LC, Bielemann RM, Madruga SW, Orlandi SP, et al. Desenho de um questionário de frequência alimentar digital autoaplicado para avaliar o consumo alimentar de adolescentes e adultos jovens: coortes de nascimentos de Pelotas, Rio Grande do Sul. *Rev Bras Epidemiol*. 2016;19(2):419-32.
38. TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. In: NEPA, editor. 4th edition ed. UNICAMP/SP2011. p. 161.
39. U.S. Department of Agriculture ARS. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24. In: Laboratory ND, editor. 2011.
40. Hallberg L, Hulthen L. Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(5):1147-60.
41. Oxalate (oxalic acid) content of 750+ foods, with numbers from university and government sources. Available from: <http://oxalate.org/> Accessed 2017 Nov 03.
42. Wirfalt E, Drake I, Wallstrom P. What do review papers conclude about food and dietary patterns? *Food & nutrition research*. 2013;57.
43. Newby PK, Tucker KL. Empirically derived eating patterns using factor or cluster analysis: a review. *Nutrition reviews*. 2004;62:177-203.
44. The Scree Test For The Number Of Factors. *Multivariate Behavioral Research*. 1966;1(2):245-76.
45. Hu FB. Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology. *Current opinion in lipidology*. 2002;13:3-9.
46. Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc*. 2003;35(8):1381-95.
47. Pate RR, Pratt M, Blair SN, Haskell WL, Macera CA, Bouchard C, et al. Physical activity and public health. A recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. *JAMA*. 1995;273(5):402-7.

48. Leonard MB, Elmi A, Mostoufi-Moab S, Shults J, Burnham JM, Thayu M, et al. Effects of sex, race, and puberty on cortical bone and the functional muscle bone unit in children, adolescents, and young adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(4):1681-9.
49. Alswat KA. Gender Disparities in Osteoporosis. *J Clin Med Res.* 2017;9(5):382-7.
50. U.S. Department of Agriculture ARS. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24. In: Laboratory ND, editor. 2011.
51. Weaver CM, Gordon CM, Janz KF, Kalkwarf HJ, Lappe JM, Lewis R, et al. The National Osteoporosis Foundation's position statement on peak bone mass development and lifestyle factors: a systematic review and implementation recommendations. *Osteoporos Int* 2016;27(4):1281-386.
52. Bolland MJ, Leung W, Tai V, Bastin S, Gamble GD, Grey A, et al. Calcium intake and risk of fracture: systematic review. *BMJ* 2015;351:h4580.
53. Burckhardt P. Calcium revisited, part III: effect of dietary calcium on BMD and fracture risk. *Bonekey Rep.* 2015;4:708.
54. Lappe JM, Watson P, Gilsanz V, Hangartner T, Kalkwarf HJ, Oberfield S, et al. The longitudinal effects of physical activity and dietary calcium on bone mass accrual across stages of pubertal development. *J Bone Miner Res.* 2015;30(1):156-64.
55. Carter LM, Whiting SJ, Drinkwater DT, Zello GA, Faulkner RA, Bailey DA. Self-reported calcium intake and bone mineral content in children and adolescents. *J Am Coll Nutr.* 2001;20(5):502-9.
56. Lee KJ, Kim KS, Kim HN, Seo JA, Song SW. Association between dietary calcium and phosphorus intakes, dietary calcium/phosphorus ratio and bone mass in the Korean population. *Nutr J.* 2014;13(1):114.
57. Lloyd T, Chinchilli VM, Johnson-Rollings N, Kieselhorst K, Egli DF, Marcus R. Adult female hip bone density reflects teenage sports-exercise patterns but not teenage calcium intake. *Pediatrics* 2000;106:40-4.
58. U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture. 2015-2020 Dietary Guidelines for Americans. 8th Edition. December 2015. Available at <http://health.gov/dietaryguidelines/2015/guidelines/>.

59. Radominski SC, Bernardo W, Paula AP, Albergaria B, Moreira C, Fernandes CE, et al. Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2017;57(S2):452-66.
60. WHO. World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation, Geneva, 28 January - 1 February 2002. 2003.
61. Yang Q, Lin SL, Au Yeung SL, Kwok MK, Xu L, Leung GM, et al. Genetically predicted milk consumption and bone health, ischemic heart disease and type 2 diabetes: a Mendelian randomization study. *Eur J Clin Nutr*. 2017;71(8):1008-12.
62. Moskal A, Pisa PT, Ferrari P, Byrnes G, Freisling H, Boutron-Ruault MC, et al. Nutrient patterns and their food sources in an International Study Setting: report from the EPIC study. *PLoS One*. 2014;9(6):e98647.
63. WHO. World Health Organization. Report of a Joint FAO/WHO Consultation. Preparation and use of food based dietary guidelines. Geneva: World Health Organization; 1998.
64. Tucker KL, Chen H, Hannan MT, Cupples LA, Wilson PW, Felson D, et al. Bone mineral density and dietary patterns in older adults: the Framingham Osteoporosis Study. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(1):245–52.
65. Okubo H, Sasaki S, Horiguchi H, Oguma E, Miyamoto K, Hosoi Y, et al. Dietary patterns associated with bone mineral density in premenopausal Japanese farmwomen. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(5):1185–92.
66. Kontogianni MD, Melistas L, Yannakoulia M, Malagaris I, Panagiotakos DB, Yiannakouris N. Association between dietary patterns and indices of bone mass in a sample of Mediterranean women. *Nutrition*. 2009;25(2):165-71.
67. Benetou V, Orfanos P, Pettersson-Kymmer U, Bergström U, Svensson O, Johansson I, et al. Mediterranean diet and incidence of hip fractures in a European cohort. *Osteoporos Int*. 2013;24(5):1587-98.
68. Zeng FF, Xue WQ, Cao WT, Wu BH, Xie HL, Fan F, et al. Diet-quality scores and risk of hip fractures in elderly urban Chinese in Guangdong, China: a case-control study. *Osteoporos Int* 2014;25(8):2131-41.

69. Movassagh EZ, Vatanparast H. Current Evidence on the Association of Dietary Patterns and Bone Health: A Scoping Review. *Adv Nutr Res*. 2017;8(1):1-16.
70. Ferreira PM, Papini SJ, Corrente JE. Diversity of eating patterns in older adults: A new scenario? . *Revista de Nutrição*. 2014;27:67-79.
71. Cade J, Thompson R, Burley V, Warm D. Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires - a review. *Public Health Nutr*. 2002;5(4):567-87.
72. Cade JE, Burley VJ, Warm DL, Thompson RL, Margetts BM. Food frequency questionnaires: a review of their design, validation and utilisation. *Nutr Res Rev*. 2004;17(1):5-22.
73. Aloia JF, Dhaliwal R, Shieh A, Mikhail M, Fazzari M, Ragolia L, et al. Vitamin D supplementation increases calcium absorption without a threshold effect. *Am J Clin Nutr* 2014;99(3):624–31.
74. Brix N, Ernst A, Lauridsen LLB, Parner E, Støvring H, Olsen J, et al. Timing of puberty in boys and girls: A population-based study. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2019;33(1):70-8.
75. Cumpian-Silva J, Rinaldi AEM, Mazzeti CMS, Conde WL. Fenótipos corporais na adolescência e a maturação sexual. *Cad Saúde Pública*. 2018;34(3):e00057217.

Table 1. Characteristics of participants with complete data at both 18th and 22th-year follow-ups compared with those participants with missing data, loss of follow-up or death, stratified by sex. The 1993 Pelotas Birth Cohort, Brazil.

Variables	<i>Men</i>		<i>p-value</i>	<i>Women</i>		<i>p-value</i>
	Mean or median (SD or p25-p75); %			Mean or median (SD or p25-p75); %		
	Participants included N=1,456	Participants excluded ¹ N=1,147		Participants included N=1,653	Participants excluded ¹ N=992	
<i>Perinatal</i>						
Maternal education (years)	N=1,454	N=1,145	0.151 ^a	N=1,650	N=992	0.011 ^a
0-4	25.4	29.3		27.0	32.1	
5-8	47.5	45.5		47.0	44.2	
9-11	18.4	17.6		18.3	15.1	
≥ 12	8.7	7.6		7.7	8.7	
Family income (MMW)	N=1,435	N=1,112	0.011 ^a	N=1,619	N=970	0.329 ^a
≤ 1	17.6	21.0		17.4	20.3	
1.1-3	42.3	42.4		41.8	40.6	
3.1-6	24.7	19.8		24.8	23.5	
> 6	15.4	16.8		16.0	15.6	
Gestational age (weeks)	N=1,438	N=1,112	0.245 ^a	N=1,631	N=958	0.001 ^a
< 34	1.1	2.1		1.2	3.0	
34-36	6.2	6.4		7.9	6.5	
37-40	76.1	75.9		77.3	79.3	
> 40	16.6	15.6		13.6	11.2	
Weight (grams)	N=1,455	N=1,140	0.010 ^a	N=1,652	N=985	0.001 ^a
< 2500	7.5	10.3		11.0	10.5	
2500-2999	22.7	18.8		26.4	33.6	
3000-3999	63.6	63.7		59.0	53.4	
≥ 4000	6.2	7.2		3.6	2.5	
Length (cm)	N=1,443	N=1,117	0.887 ^b	N=1,640	N=962	0.069 ^b
	49.1 (2.3)	49.1 (2.6)		48.5 (2.3)	48.3 (2.3)	
<i>15 years</i>						
Skin color	N=1,387	N=723	0.363 ^a	N=1,630	N=583	0.175 ^a
White	63.6	65.7		62.9	66.2	
Black, brown or other	36.4	34.3		37.1	33.8	
<i>18 years</i>						
Smoking habit	N=1,455	N=559	0.038 ^a	N=1,653	N=438	0.007 ^a
No	85.8	81.9		88.0	82.9	
Yes	14.2	18.1		12.0	17.1	
Moderate and vigorous physical activity (min/week)	N=1,410	N=539	0.610 ^c	N=1,640	N=434	0.418 ^c
	477.5	440.0		240.0	290.0	

Variables	Men		<i>p</i> -value	Women		<i>p</i> -value
	Mean or median (SD or p25-p75); %			Mean or median (SD or p25-p75); %		
	Participants included N=1,456	Participants excluded ¹ N=1,147		Participants included N=1,653	Participants excluded ¹ N=992	
	(240.0; 810.0)	(240.0; 840.0)		(107.5; 497.5)	(120.0; 525.0)	
Total calorie intake (kcal)	N=1,456 2759.7 (1,948.1; 4,203.0)	N=537 2656.6 (1,825.6; 4,082.8)	0.089 ^c	N=1,653 2370.1 (1,630.9; 3,696.1)	N=423 2491.1 (1,709.9; 4,071.4)	0.277 ^c
Soft drink consumption (kcal)	N=1,453 35.7 (17.8; 125.3)	N=537 35.7 (17.8; 125.3)	0.661 ^c	N=1,648 35.7 (11.9; 89.2)	N=421 35.7 (11.9; 125.3)	0.630 ^c
<i>22 years</i>						
Height (cm)	N=1,456 174.0 (6.7)	N=247 176.7 (9.0)	<0.001 ^b	N=1,653 161.2 (6.5)	N=236 160.4 (7.0)	0.087 ^b
Whole body BMD (g/cm²)	N=1,456 1.3 (0.1)	N=91 1.2 (0.1)	0.033 ^b	N=1,653 1.2 (0.1)	N=128 1.2 (0.1)	0.603 ^b
Lumbar spine BMD (g/cm²)	N=1,452 1.2 (0.1)	N=120 1.2 (0.2)	0.993 ^b	N=1,649 1.2 (0.1)	N=131 1.2 (0.1)	0.759 ^b
Right femur BMD (g/cm²)	N= 1,455 1.2 (0.2)	N=117 1.2 (0.2)	0.510 ^b	N=1,651 1.0 (0.1)	N=129 1.0 (0.1)	0.745 ^b

N: Number of observations; SD: standard deviation; %: percentage; MMW: monthly minimum wages; BMD: bone mineral density (g/m²).

¹ Participants excluded from the analyses due to loss of follow-up or missing data;

^a *P* value refers to Chi-squared heterogeneity test;

^b *P* value refers to Student's *t*-test;

^c *P* value refers to Wilcoxon Rank Sum Test.

Table 2. Adjusted analyses and adjusted R-squared (R^2) of the association between milk consumption from 18 to 22 years and bone mineral density (g/cm^2) at 22 years of age. The 1993 Pelotas Birth Cohort, Brazil.

Variable	<i>Men</i>					
	Whole body BMD		Lumbar spine BMD		Right femur BMD	
Milk consumption 18 - 22 years	Mean ¹ (95%CI) (N=1,308)	<i>p</i> -value	Mean ¹ (95%CI) (N=1,304)	<i>p</i> -value	Mean ¹ (95%CI) (N=1,307)	<i>p</i> -value
	$R^2=11.74$	0.215	$R^2=6.93$	0.078	$R^2=8.44$	0.024
Low	1.273 (1.259; 1.287)		1.255 (1.234; 1.276)		1.190 (1.165; 1.215)	
Moderate	1.273 (1.261; 1.284)		1.240 (1.223; 1.257)		1.191 (1.171; 1.210)	
High	1.259 (1.241; 1.278)		1.212 (1.184; 1.240)		1.148 (1.116; 1.181)	
Increase	1.263 (1.252; 1.274)		1.225 (1.208; 1.241)		1.154 (1.135; 1.174)	
Decrease	1.277 (1.269; 1.285)		1.241 (1.229; 1.253)		1.181 (1.167; 1.194)	
Variable	<i>Women</i>					
	Whole body BMD		Lumbar spine BMD		Right femur BMD	
Milk consumption 18 - 22 years	Mean ¹ (95%CI) (N=1,544)	<i>p</i> -value	Mean ¹ (95%CI) (N=1,540)	<i>p</i> -value	Mean ¹ (95%CI) (N=1,542)	<i>p</i> -value
	$R^2=6.76$	0.686	$R^2=4.87$	0.737	$R^2=6.62$	0.134
Low	1.160 (1.151; 1.169)		1.206 (1.192; 1.221)		1.026 (1.021; 1.051)	
Moderate	1.162 (1.153; 1.171)		1.207 (1.193; 1.222)		1.041 (1.026; 1.056)	
High	1.148 (1.132; 1.165)		1.191 (1.163; 1.218)		1.013 (0.985; 1.041)	
Increase	1.159 (1.150; 1.167)		1.200 (1.187; 1.214)		1.034 (1.020; 1.048)	
Decrease	1.159 (1.152; 1.165)		1.198 (1.188; 1.209)		1.021 (1.010; 1.032)	

N: number of observations; 95%CI: 95% confidence interval; BMD: bone mineral density (g/m^2); R^2 : adjusted R-squared.

P-value refers to Wald's test for heterogeneity.

Low = categories "never or less than once per month" or "one to three times per month" at both follow-ups; Moderate = categories "once per week"; "two to four times per week"; "five to six times per week"; or "once per day" at both follow-ups; High = categories "two to four times per day" or "five or more times per day" at both

follow-ups; Increase = category representing any increase in frequency of consumption observed at the two follow-ups and Decrease = for any decrease in frequency of consumption at the two follow-ups.

¹ Adjusted for variables collected during the perinatal period (family income, maternal education, gestational age, birth weight, length at birth), at 15 years (skin color), 18 years (smoking habit, moderate and vigorous physical activity, soft drink consumption, total calorie intake) and 22 years of age (height).

Table 3. Adjusted analyses and adjusted R-squared (R^2) of the association between dietary calcium intake from 18 to 22 years and bone mineral density (g/cm^2) at 22 years of age. The 1993 Pelotas Birth Cohort, Brazil.

Variable	<i>Men</i>					
	Whole body BMD		Lumbar spine BMD		Right femur BMD	
Calcium intake	Mean ¹ (95%CI)	<i>p</i> -value	Mean ¹ (95%CI)	<i>p</i> -value	Mean ¹ (95%CI)	<i>p</i> -value
18 - 22 years	(N=1,308)		(N=1,304)		(N=1,307)	
	$R^2=11.62$	0.435	$R^2=6.67$	0.310	$R^2=7.78$	0.721
Low	1.272 (1.260; 1.283)		1.241 (1.223; 1.259)		1.171 (1.150; 1.192)	
Moderate	1.272 (1.258; 1.286)		1.242 (1.221; 1.263)		1.185 (1.160; 1.209)	
High	1.271 (1.258; 1.284)		1.236 (1.217; 1.256)		1.188 (1.166; 1.211)	
Increase	1.278 (1.269; 1.287)		1.245 (1.231; 1.259)		1.173 (1.156; 1.189)	
Decrease	1.264 (1.253; 1.274)		1.222 (1.207; 1.238)		1.172 (1.153; 1.191)	
Variable	<i>Women</i>					
	Whole body BMD		Lumbar spine BMD		Right femur BMD	
Calcium intake	Mean ¹ (95%CI)	<i>p</i> -value	Mean ¹ (95%CI)	<i>p</i> -value	Mean ¹ (95%CI)	<i>p</i> -value
18 - 22 years	(N=1,544)		(N=1,540)		(N=1,542)	
	$R^2=6.70$	0.878	$R^2=4.81$	0.904	$R^2=6.29$	0.812
Low	1.158 (1.148; 1.169)		1.202 (1.185; 1.219)		1.034 (1.016; 1.051)	
Moderate	1.163 (1.153; 1.173)		1.209 (1.192; 1.225)		1.038 (1.021; 1.055)	
High	1.159 (1.151; 1.168)		1.201 (1.186; 1.215)		1.029 (1.014; 1.044)	
Increase	1.159 (1.151; 1.167)		1.202 (1.188; 1.215)		1.026 (1.012; 1.039)	
Decrease	1.156 (1.149; 1.164)		1.198 (1.185; 1.210)		1.027 (1.014; 1.040)	

N: number of observations; 95%CI: 95% confidence interval; BMD: bone mineral density (g/m^2); R^2 : adjusted R-squared.

P-value refers to Wald's test for heterogeneity.

Low = categories "never or less than once per month" or "one to three times per month" at both follow-ups; Moderate = categories "once per week"; "two to four times per week"; "five to six times per week"; or "once per day" at both follow-ups; High = categories "two to four times per day" or "five or more times per day" at both follow-ups; Increase = category representing any increase in frequency of consumption observed at the two follow-ups and Decrease = for any decrease in frequency of consumption at the two follow-ups.

¹ Adjusted for variables collected during the perinatal period (family income, maternal education, gestational age, birth weight, length at birth), at 15 years (skin color), 18 years (smoking habit, moderate and vigorous physical activity, soft drink consumption, total calorie intake) and 22 years of age (height).

Table 4. Adjusted analyses and adjusted R-squared (R^2) of the association between bone-friendly nutrient pattern from 18 to 22 years and bone mineral density (g/cm^2) at 22 years of age. The 1993 Pelotas Birth Cohort, Brazil.

Variable	<i>Men</i>					
	Whole body BMD		Lumbar spine BMD		Right femur BMD	
Bone-friendly 18 - 22 years	Mean ¹ (95%CI) (N=1,308)	<i>p</i> -value	Mean ¹ (95%CI) (N=1,304)	<i>p</i> -value	Mean ¹ (95%CI) (N=1,307)	<i>p</i> -value
	$R^2=11.92$	0.079	$R^2=6.63$	0.377	$R^2=8.31$	0.052
Low	1.281 (1.267; 1.295)		1.251 (1.229; 1.272)		1.191 (1.167; 1.216)	
Moderate	1.285 (1.272; 1.299)		1.246 (1.226; 1.266)		1.204 (1.181; 1.228)	
High	1.263 (1.251; 1.274)		1.231 (1.214; 1.249)		1.158 (1.138; 1.179)	
Increase	1.266 (1.256; 1.277)		1.228 (1.212; 1.244)		1.172 (1.153; 1.191)	
Decrease	1.271 (1.262; 1.281)		1.239 (1.225; 1.254)		1.173 (1.156; 1.190)	
Variable	<i>Women</i>					
	Whole body BMD		Lumbar spine BMD		Right femur BMD	
Bone-friendly 18 - 22 years	Mean ¹ (95%CI) (N=1,544)	<i>p</i> -value	Mean ¹ (95%CI) (N=1,540)	<i>p</i> -value	Mean ¹ (95%CI) (N=1,542)	<i>p</i> -value
	$R^2=6.80$	0.590	$R^2=4.91$	0.644	$R^2=6.33$	0.687
Low	1.162 (1.154; 1.171)		1.201 (1.187; 1.215)		1.032 (1.018; 1.046)	
Moderate	1.161 (1.150; 1.172)		1.213 (1.195; 1.231)		1.040 (1.021; 1.059)	
High	1.150 (1.138; 1.161)		1.192 (1.173; 1.211)		1.023 (1.003; 1.043)	
Increase	1.161 (1.153; 1.168)		1.203 (1.190; 1.215)		1.032 (1.019; 1.045)	
Decrease	1.159 (1.151; 1.167)		1.201 (1.188; 1.214)		1.024 (1.011; 1.038)	

N: number of observations; 95%CI: 95% confidence interval; BMD: bone mineral density (g/m^2); R^2 : adjusted R-squared.

P-value refers to Wald's test for heterogeneity.

Low = corresponding to the lowest tertiles of calcium intake at both follow-ups; Moderate = corresponding to the intermediate tertiles at both follow-ups; High = corresponding to the first tertile of consumption at both follow-ups; Increase = any increase in the tertiles of nutrient patterns at the two follow-ups and Decrease = any decrease in tertiles of patterns at the two follow-ups;

¹ Adjusted for variables collected during the perinatal period (family income, maternal education, gestational age, birth weight, length at birth), at 15 years (skin color), 18 years (smoking habit, moderate and vigorous physical activity, soft drink consumption, total calorie intake) and 22 years of age (height).

Table 5. Adjusted analyses and adjusted R-squared (R^2) of the association between bone-unfriendly nutrient pattern from 18 to 22 years and bone mineral density (g/cm^2) at 22 years of age. The 1993 Pelotas Birth Cohort, Brazil.

Variable	<i>Men</i>					
	Whole body BMD		Lumbar spine BMD		Right femur BMD	
Bone- unfriendly	Mean ¹ (95%CI)	<i>p</i> -value	Mean ¹ (95%CI)	<i>p</i> -value	Mean ¹ (95%CI)	<i>p</i> -value
18 - 22 years	(N=1,308)		(N=1,304)		(N=1,307)	
	$R^2=12.20$	0.015	$R^2=6.58$	0.459	$R^2=8.40$	0.059
Low	1.282 (1.268; 1.296)		1.241 (1.221; 1.262)		1.177 (1.152; 1.201)	
Moderate	1.280 (1.267; 1.293)		1.244 (1.224; 1.264)		1.198 (1.175; 1.221)	
High	1.254 (1.243; 1.266)		1.223 (1.206; 1.240)		1.156 (1.136; 1.175)	
Increase	1.273 (1.263; 1.282)		1.239 (1.225; 1.254)		1.168 (1.151; 1.185)	
Decrease	1.273 (1.263; 1.283)		1.241 (1.225; 1.256)		1.189 (1.171; 1.207)	
Variable	<i>Women</i>					
	Whole body BMD		Lumbar spine BMD		Right femur BMD	
Bone- unfriendly	Mean ¹ (95%CI)	<i>p</i> -value	Mean ¹ (95%CI)	<i>p</i> -value	Mean ¹ (95%CI)	<i>p</i> -value
18 - 22 years	(N=1,544)		(N=1,540)		(N=1,542)	
	$R^2=6.93$	0.289	$R^2=4.85$	0.812	$R^2=6.36$	0.600
Low	1.164 (1.155; 1.172)		1.198 (1.184; 1.212)		1.032 (1.017; 1.046)	
Moderate	1.163 (1.153; 1.173)		1.204 (1.187; 1.220)		1.031 (1.013; 1.048)	
High	1.149 (1.139; 1.160)		1.194 (1.177; 1.211)		1.016 (0.999; 1.034)	
Increase	1.160 (1.152; 1.168)		1.206 (1.193; 1.219)		1.033 (1.020; 1.046)	
Decrease	1.158 (1.150; 1.165)		1.203 (1.191; 1.216)		1.032 (1.020; 1.045)	

N: number of observations; 95%CI: 95% confidence interval; BMD: bone mineral density (g/m^2); R^2 : adjusted R-squared.

P-value refers to Wald's test for heterogeneity.

Low = corresponding to the first tertile of nutrient patterns at the two follow-ups; Moderate = corresponding to the intermediate tertile at both follow-ups; High = corresponding to the third tertile of consumption at both follow-ups; Increase = any increase in the tertiles of nutrient patterns at the two follow-ups and Decrease = any decrease in tertiles of patterns at the two follow-ups;

¹ Adjusted for variables collected during the perinatal period (family income, maternal education, gestational age, birth weight, length at birth), at 15 years (skin color), 18 years (smoking habit, moderate and vigorous physical activity, soft drink consumption, total calorie intake) and 22 years of age (height).

Supplementary Material

Table 1. Distribution of factor-loadings of dietary patterns at 18 years of age. The 1993 Pelotas Birth Cohort, Brazil.

Nutrients	Dietary pattern	
	Bone-friendly	Bone-unfriendly
Phytate	0.34	0.25
Oxalate	0.41	0.11
Protein	0.43	-0.09
Calcium	0.42	-0.26
Vitamin D	0.35	-0.41
Sodium	0.43	-0.07
Caffeine	0.23	0.82
Number of items	4	2
Variance (%)	69,6	12,2
Accumulated variance (%)	69,6	81,8

Note: Factorial loads with values greater than 0.40 are in bold.

Artigo 2

Associations between body mass index, body composition and bone density in young adults: Findings from a South Brazilian Cohort

Submetido à BMC Musculoskeletal Disorders

Normas: <https://bmcmusculoskeletdisord.biomedcentral.com/submission-guidelines/preparing-your-manuscript/research-article>

**Associations between body mass index, body composition and bone density in
young adults: Findings from a South Brazilian Cohort**

Body composition and bone density

Isabel Oliveira Bierhals^{1*}

E-mail: isabelbierhals@gmail.com

Juliana dos Santos Vaz²

E-mail: juliana.vaz@gmail.com

Renata Moraes Bielemann²

E-mail: renatabielemann@hotmail.com

Christian Loret de Mola²

E-mail: chlmz@yahoo.com

Fernando Celso Barros³

E-mail: fcbarros.epi@gmail.com

Helen Gonçalves²

E-mail: hdgs.epi@gmail.com

Fernando César Wehrmeister²

E-mail: fcwehrmeister@gmail.com

Maria Cecília Formoso Assunção²

E-mail: cecilia.epi@gmail.com

¹ MSc. Federal University of Pelotas - Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

² PhD. Federal University of Pelotas - Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

³ PhD. Catholic University of Pelotas - Postgraduate Program in Health and Behavior, Pelotas, RS, Brazil.

***Corresponding author:** Rua Marechal Deodoro, 1160 – 3º andar, Pelotas/RS, 96020-220, Brazil. Phone: + 55-53-32841300.

E-mail: isabelbierhals@gmail.com

Abstract

Background: This study aimed to evaluate the association of body composition components and obesity with bone density.

Methods: Prospective study with data on 2,968 members of the 1993 Pelotas Birth Cohort from follow-ups at 18 and 22 years of age. Areal bone mineral density (aBMD, g/cm²) was evaluated for whole body, lumbar spine, and femoral neck at 22 years using dual-energy X-ray absorptiometry. Simple and multiple linear regression, stratified by sex, were used to assess the effect of BMI, fat mass (FMI) and lean mass index (LMI), evaluated at 18 and 22 years, and obesity trajectories classified by FMI and categorized as “never”, “only at 18 years”, “only at 22 years” or “always” on aBMD.

Results: Among men, the largest coefficients were observed for BMI, followed by lean mass and fat mass. Compared to fat mass, lean mass presented the largest coefficients for all sites, with the strongest associations observed for the femoral neck (β : 0.035 g/cm²; 95% CI: 0.031; 0.039 for both follow-ups), while the largest effect for FMI was observed for whole-body aBMD at 18 years (β : 0.019 g/cm²; 95% CI: 0.014; 0.024). Among women, the strongest associations were observed for LMI. The largest coefficients for LMI and FMI were observed for femoral neck at age 18, presented β : 0.030 g/cm², 95% CI: 0.026, 0.034 for LMI and β : 0.012 g/cm²; 95% CI: 0.009; 0.015) for FMI. Men who were “always obese” according to FMI had smallest aBMD for spine (β : -0.014; 95%CI: -0.029; -0.001). Women who were obese “only at 18 years” had smallest aBMD for the whole-body (β : -0.013; 95%CI: -0.023; -0.002), whereas those who were obese “only at 22 years” had larger whole-body and femoral neck aBMD (β : 0.013; 95%CI: 0.009; 0.017 and β : 0.027; 95%CI: 0.016; 0.038, respectively) and those “always obese” for whole-body aBMD (β : 0.005; 95%CI: 0.001; 0.011) compared to the reference category.

Conclusions: The indexes were positively associated with aBMD in this sample. Fat mass had smaller positive influence on these outcomes than lean mass, suggesting the most important body composition component for bone density is the lean mass.

Keywords: Cohort studies; Bone density; Nutritional status; Body composition; Obesity.

Background

Peak bone mass is reached at the start of adulthood, determines fracture risk in adults,¹ and has the potential to delay the onset of advanced age osteoporosis by 13 years.² Factors that affect it negatively, particularly during adolescence, can result in an increased risk of fracture and osteoporosis later in life.³

The interaction between obesity and bone metabolism is complex and has not been entirely elucidated.⁴ By 2030, obesity will affect more than one billion people,⁵⁻⁷ and total attributed healthcare costs may reach US\$ 957 billion.⁸ It had been thought that obesity, when defined as a high body mass index (BMI), had a protective effect on the skeleton,⁹ since it is related to increased bone mineral content and bone mineral density (BMD)¹⁰⁻¹³ and exerts a greater mechanical load on the bones.¹⁴ However, the influence of the two principal components of body weight – fat mass (FM) and lean mass (LM) – on BMD is still a subject of debate.¹⁵⁻¹⁸ While the literature consistently shows that LM has a positive association with bone health,^{15, 16, 19, 20} the National Osteoporosis Foundation recently concluded that the effect of FM on the accumulation of bone mass in young populations is still open for debate.¹⁹

A wide selection of investigations has observed that adiposity has a negative effect on bone mass.^{11, 20-24} In a recent meta-analysis, Dolan et al.²⁴ stratified samples by age and found that adiposity had a negative effect on the bone mass of people under the age of 25 years, suggesting that the negative influence of increasing adiposity is more striking when bone metabolism is in a state of flux, as is the case during the growth period.²⁴

The objective of this study was to evaluate the effect of body composition components (FM and LM, evaluated as an index) and BMI at 18 and 22 years and trajectory of obesity among the follow-ups on bone density at 22 years, using data from a population cohort of young adults born in the Southern Brazil and followed since birth.

Methods

The 1993 Pelotas Birth Cohort

In 1993, all maternity units in the city of Pelotas were visited daily, and 5,265 births to women residing in the urban area of Pelotas between January 1 and December 31 were identified.²⁵ A total of 5,249 mothers agreed to enroll in the study, and their newborn infants were examined. After the perinatal interviews, subsets were assessed at

the ages of 1, 3, and 6 months and at 1, 4, 6 and 9 years. At the ages of 11, 15, 18, and 22 years, all members of the original cohort were invited to further assessments. More detailed information on the methodology employed at follow-up assessments is available elsewhere.²⁵⁻²⁷

This study uses data from the follow-ups conducted at 18 and 22 years of age on all cohort members for whom information on body composition and BMI was available from both follow-ups and bone mass from the 22-year follow-up. For the latest follow-up, a digital questionnaire was constructed on the REDCap (Research Electronic Data Capture)²⁸ platform to enable electronic data collection and subsequent construction of a database.

Body composition

Body composition variables (FM, LM, and bone mass) were measured using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) (Lunar Prodigy Advance – GE®). These examinations were not conducted with pregnant participants or participants in whom there was a suspicion of pregnancy, wheelchair users, people with bone and joint deformities, or those with weight exceeding 120 kg or height exceeding 192 cm, in accordance with the manufacturer's instructions. To standardize examinations, participants were given appropriate clothing to wear and did not wear anything made of metal.

Both FM and LM at 18 and 22 years of age were expressed in kilos (kg), using whole body scans, and the respective indices were calculated from the ratio of each variable with the square of weight(kg)/[height(m)]², representing lean mass index (LMI) and fat mass index (FMI), respectively.

Areal bone mineral density (aBMD) (g/cm²) was evaluated at 22 years of age for the whole body, lumbar spine (L1-L4), and femoral neck.

BMI assessment

Weight was measured using a balance connected to an air plethysmography displacement unit (BOD POD® Gold Standard - Body Composition Tracking System) with 10 g precision. Height was measured using a wooden stadiometer with 0.1 cm precision and a maximum amplitude of 2 meters. These measurements were taken by examiners who had been trained and standardized using techniques proposed by

Habicht.²⁹ These variables, in both follow-ups (18 and 22 years), were used to calculate BMI from the ratio of body mass to the square of weight(kg)/[height(m)]².

Obesity classification

Obesity was assessed using FMI classification. In both ages, obesity was classified using cutoffs of 9 and 13 kg/m² for men and women, respectively.³⁰ Combination of obesity status at both follow-ups was used to classify individuals' trajectories as "never obese", "obese only at 18 years", "obese only at 22 years", or "always obese".

Covariates

The following perinatal variables were investigated as potential confounders: mother's educational level (0-4, 5-8, 9-11, ≥12 years of study), family income (≤1; 1.1-3; 3.1-6; >6 times the minimum wage), gestational age (<34; 34-36; 37-40; >40 weeks), mother's pregestational nutritional status (underweight, healthy weight, overweight, or obese), birth weight (<2500; 2500-2999; 3000-3999; ≥4000 grams), and birth length (centimeters). Potential confounders collected at 15 years were self-reported skin color (white; black, brown, or other). Confounders at 18 years were smoking habit (at least one cigarette per day during the month prior to the interview), total physical activity (minutes per week), and daily calcium intake (mg, obtained from a food frequency questionnaire) and at 22 years was height (centimeters).

Statistical analysis

All statistical analyses were conducted using Stata 12.1® statistical software (Stata Corp., College Station, Texas, United States) and stratified by sex, since evidence shows that there are sex-linked differences in bone mass,^{31, 32} and tested for significant interactions (p<0.1). The descriptive analysis used absolute and relative frequencies for categorical variables and means and standard deviations (SDs) or medians and interquartile ranges (p25-p75) for numerical variables. Participants included and excluded were compared using the chi-square test (categorical variables), *t*-test, or Wilcoxon Rank Sum Test (numerical variables), depending on normal or nonnormal distribution of data.

Simple and multiple linear regressions were applied to investigate associations between FMI, LMI and BMI (continuous variables, in kg/m²) at each follow-up (at 18 and 22 years of age) and aBMD at 22 years of age. To evaluate the effect according to obesity status at 18 and 22 years on bone mass, simple and multiple linear regressions

were also performed, considering “never obese” as a reference category. The association with obesity by FMI was analyzed with an adjustment for LMI. In analyses using continuous exposures, after a test significant ($p < 0.001$) for deviation from linearity between aBMD and BMI for both sexes and for FMI among the men, a quadratic term was included in the respective adjusted regressions.

Beta coefficients, 95% confidence intervals (95% CIs), and p values from the Wald test of heterogeneity were calculated to a statistical significance level of 5%. When adjusting for possible confounding factors, variables were included in the regressions according to a complete adjustment model irrespective of the level of significance of the association with the outcome in bivariate analysis.

Ethics approval

All 1993 Pelotas birth cohort follow-ups were approved by the Research Ethics Committee at the Medical Faculty of the Universidade Federal de Pelotas, and the most recent ethics approval protocol is number 1.250.366. At all stages, participants (or their legal guardians) signed free and informed consent forms.

Results

Participants studied

At 18 years of age, 4,106 participants were assessed (follow-up rate: 81.3%), while at 22 years, 3,810 individuals were interviewed (follow-up rate: 76.3%). Body composition data were available for 2,968 of the participants assessed at both follow-ups, of whom 1,560 (52.6%) were female. Table 1 shows the differences between the participants included in this study and the remainder of the cohort. For both sexes, the proportion of participants born with weights in the range 3000-3999 g was greater among those included in the study, and so was the proportion of smokers. In contrast, FMI at 18 years and BMI at both follow-ups were both greater among those excluded.

Among men, there was a higher proportion of excluded individuals with family income at birth ≤ 1 minimum wage, and whole-body bone mass was greater among those included. Among the women, there was a smaller proportion among those included whose mothers had an educational level of 0-4 years at the time of their birth and a higher proportion of those born at >40 weeks than among those excluded. Mean birth length was

greater among participants included in the study, whereas mean LMI at 18 and 22 years of age and mean FMI at 22 were greater among those excluded.

Associations between FMI, LMI, BMI and bone mass

Figure 1 illustrates the associations between FMI, LMI and BMI at 18 and 22 years and bone mass at 22 years of age. Positive effects of all three indices on bone outcomes were observed and were usually largest for the follow-up at 18 years.

For men, the largest coefficients were observed for BMI, followed by lean mass and fat mass. Compared to fat mass, the lean mass presented the largest coefficients for all sites, with the strongest associations observed for the femoral neck (β : 0.035 g/cm²; 95% CI: 0.031; 0.039 for both follow-ups) and whole-body aBMD (β : 0.026 g/cm²; 95% CI: 0.021; 0.031 at 18 years and β : 0.024 g/cm²; 95% CI: 0.019; 0.029 at 22 years). The largest effect for FMI was observed for whole-body aBMD at 18 years (β : 0.019 g/cm²; 95% CI: 0.014; 0.024) and lumbar spine, with the same coefficients for both follow-ups (β : 0.018 g/cm²; 95% CI: 0.013; 0.023).

Among women, lean mass presented the largest coefficients of aBMD gain, with the strongest associations for whole-body (β : 0.022 g/cm²; 95% CI: 0.017; 0.027 for the 18 years and β : 0.019 g/cm²; 95% CI: 0.014; 0.024 for the 22 years) and femoral neck sites (β : 0.030 g/cm², 95% CI: 0.026, 0.034 for age 18 and β : 0.026 g/cm², 95% CI: 0.022, 0.030 for age 22). For FMI, the largest effect was observed at 18 years for all sites, with strongest associations for femoral neck (β : 0.012 g/cm²; 95% CI: 0.009; 0.015) followed by lumbar spine (β : 0.011 g/cm²; 95% CI: 0.008; 0.014) and whole-body aBMD (β : 0.010 g/cm²; 95% CI: 0.007; 0.013).

Association between obesity and bone mass

Table 2 describes the relationship between obesity, classified by FMI from 18 to 22 years and bone mass at 22 years of age, showing that among men who were “obese” at both follow-ups, there was a reduction in lumbar spine aBMD compared to the reference category (β : -0.014 g/cm²; 95% CI: -0.029; -0.001). Among women, those who were obese “only at 18 years” of age presented a reduction in whole-body aBMD (β : -0.013 g/cm²; 95% CI: -0.023; -0.002), whereas those who were obese “only at 22 years” and “always obese” presented an increase in whole-body aBMD (β : 0.013 g/cm²; 95% CI: 0.009; 0.017 and β : 0.005 g/cm²; 95% CI: 0.001; 0.011, respectively). For femoral neck

aBMD, women obese “only at 22 years” had a mean increase of 0.027 g/cm² (95% CI: 0.016; 0.038), compared to those “never obese”.

Discussion

This study investigated the effect of body composition components (FMI and LMI) and BMI at 18 and 22 years and trajectory of obesity on bone density at 22 years. Our results suggest that despite the effect of BMI on bone mass, the impact of lean mass and fat mass differed, with a largest effect observed for lean mass. For both body composition components, the strongest associations were observed at 18 years. According to obesity classification, there was a negative effect in the lumbar spine among men who were “always obese”. For women, the negative effect was observed in the whole body between those who was obese “only at 18 years”. Between those who was obese “only at 22 years” and “always obese” presented a density increase in whole-body and femoral neck.

According to the literature, at age 18, approximately 90% of the bone mass will have been accumulated.³³ The remainder of BMD accumulation occurs during late adolescence, up to the age of 21-25 years. The exact age at which bone accumulation reaches a plateau varies with sex and the region of the skeleton.³⁴ The peak bone mass of the proximal femur sites occurs around the age of 20 years, while the total body mass reaches its peak between 6 and 10 years later.³⁵ Many studies have estimated peak bone mass from cross-sectional data,³⁶⁻³⁸ and others have assessed the longitudinal change,³⁹⁻⁴² but only a few have used longitudinal assessment in a population-based sample including teens and young adults.^{34, 43}

Berger et al. (2010) found that most bone accumulation, especially of the spine and hip, occurs before age 16 in men and women, with more than 94% of peak bone mass already reached by that age.³⁴ Lu et al. (2016), however, observed that total accumulation ranged from early to late 20s for both sexes, with women reaching their peaks significantly earlier.⁴³ Additionally, weight, height and BMI had a significant effect on bone tracking.⁴³ These results indicate that early intervention before and during puberty is necessary to achieve optimal peak bone mass.

The present study confirms that the body composition components affect bone mass with unequal magnitude in an important period of bone accumulation before reaching peak bone mass. This is important because attaining a high peak bone mass in early life predicts a higher bone mass and a reduced risk of osteopenia or osteoporosis later in life.¹ The effects are probably due to different causes, through mechanisms that

go beyond the effect of the direct load on the skeleton;¹⁵ genetic, environmental, and hormonal factors are also involved.⁴⁴⁻⁴⁶

The literature shows that obesity in adulthood can be protective against osteoporotic fractures,^{9, 10, 18, 47} whereas at younger ages, obesity can have negative effects that are specific to bone.^{11, 18, 22-24} Differences in age, severity, and duration of obesity, particularly among longitudinal studies of the subject,⁴⁸⁻⁵⁰ may explain these conflicting results.⁴⁹⁻⁵¹ In the current study, the obesity classification revealed a negative association with aBMD in men. Among women, although most of the observed effects were positive, a negative effect was observed among those obese "only at 18 years". It should be highlighted that this analysis was adjusted for LMI when obesity was classified by FMI, thereby removing the effect of this component. Besides, in both sexes, most of the effects were largest when evaluated at 18 years, showing a lag time between these measures of body composition and bone mass. To confirm this, we performed a transversal analysis to assess the effect of LMI, FMI and BMI at age 18, on bone mass also at 18 years. We can observe that the magnitude of this transversal association was lower, mainly for FMI and BMI exposures (data not shown), reinforcing the existence of this latency period. We also performed analyses on the effect of 18-year exposures on change in bone mass between 18 and 22 years, and we found a positive effect for the whole body, but negative effects could be observed for the sites of the spine and femoral neck.

In addition to mechanical loading, adipose tissue can have an indirect positive effect on bone metabolism via adipokine, cytokines and hormones and can stimulate bone formation by producing estrogens from steroid precursors, increasing the levels of leptin and insulin in the circulation.⁵²⁻⁵⁵ However, adipose tissue also produces adiponectin and cytokines related to inflammation, such as tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6), which can have harmful effects on the bones.^{52-54, 56} In the present study, we observed a positive effect of FMI, although it was visibly inferior to that observed for LMI, which leads us to suppose that the small duration of time elapsed between collection of exposure and outcome data may have prevented the manifestation of the negative effect of body fat.

Evidence points to the existence of an FM threshold that, if exceeded during critical periods of skeletal development — particularly in adolescence — may result in skeletal fragility and ultimately a greater risk of fracture.^{3, 20, 57, 58} Measures of bone content, density, and strength improve to the extent that LM and FM increase until a "fat threshold" is reached, beyond which additional fat has harmful effects on the growing

skeleton.^{58,59} According to a recent meta-analysis, a greater negative correlation between relative adiposity (in percentages) and bone density was observed in obese people ($r = -0.20$) than in those who were overweight ($r = -0.08$), indicating that the negative impact of adiposity on BMD increases to the extent that adiposity progresses from the overweight category to obese levels, which was particularly evident among men and among those under the age of 25 years.²⁴

The present study has important strengths, such as aBMD measurements obtained using DXA, the gold standard for bone mass evaluation; a high follow-up rate; the possibility of assessing the association between obesity and bone mass adjusted for potential confounding factors assessed prospectively over the life course, e.g., maternal characteristics at birth and maternal nutritional status; and measurement of exposure at two points in time.

The main limitation of the present study is the short time period investigated. However, in the 1993 cohort, body composition was first evaluated at 18 years of age. We encourage studies of younger cohorts to include the assessment of body composition at early stages to better explore the longer effects of body composition on bone health, including subsequent follow-ups of the 1993 cohort. This recommendation is further justified by the fact that the literature on this topic generally evaluates the relationship between body composition and bone mass in older populations⁶⁰⁻⁶² and in premenopausal and postmenopausal women.^{15, 63, 64} Another limitation is the lack of data on peak bone growth in our population.

Conclusions

This study observed positive effects of FMI and LMI on bone density at 22 years, with a largest effect observed for lean mass. For both body composition components, the strongest associations were observed at 18 years. According to obesity classification, some negative effects were found at 22 years. These findings emphasize that the body composition components have different effects on bone mass and raise questions about the effects of fat mass at young ages, especially whether the longer time of adiposity exposure may have harmful consequences for bone health.

List of abbreviations

aBMD: Areal bone mineral density

BMD: Bone mineral density

BMI: Body mass index

DXA: Dual-energy X-ray absorptiometry

FM: Fat mass

FMI: Fat mass index

IL-6: interleukin 6

LM: Lean mass

LMI: Lean mass index

MMW: monthly minimum wages

REDCap: Research Electronic Data Capture

SD: standard deviations

TNF- α : tumor necrosis factor α

WHO: World Health Organization

95% CI: 95% confidence intervals

Declarations

Ethics approval and consent to participate

All the follow-ups of the 1993 Pelotas Birth Cohort Study were approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Pelotas Medical School under permit number 1.250.366. At all stages, the participants (or their legal guardians up to 15 years old follow-up) signed an informed consent form.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

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. The 22-year follow-up was supported by the Science and Technology Department/Brazilian Ministry of Health, with resources transferred through the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), grant 400943/2013-1.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Author contributions

I. O. B., J. S. V. and M. C. F. A. designed research; I. O. B. performed statistical analyses; I. O. B, J. S. V, R. M. B. and M. C. F. A. wrote the paper. J. S. V., M. C. F. A., R. M. B. C. L. M., F. C. B., H. G. and F. C. W. reviewed all the drafts of the manuscript and contributed with suggestions to the work. I. O. B., J. V. and M. C. F. A. had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

Table 1. Characteristics of participants with complete data at both 18th and 22th-year follow-ups compared with those participants with missing data, loss of follow-up or death, stratified by sex. The 1993 Pelotas Birth Cohort, Brazil.

Variables	<i>Men</i>		<i>p-value</i>	<i>Women</i>		<i>p-value</i>
	Mean or median (SD or p25-p75); %			Mean or median (SD or p25-p75); %		
	Participants included N=1,408	Participants excluded ¹ N=1,195		Participants included N=1,560	Participants excluded ¹ N=1,085	
<i>Perinatal</i>						
Maternal education (years)	N=1,406	N=1,193	0.183 ^a	N=1,557	N=1,085	0.003 ^a
0-4	25.3	29.2		26.7	32.0	
5-8	47.6	45.3		46.4	45.2	
9-11	18.6	17.5		19.0	14.5	
≥ 12	8.5	8.0		7.9	8.3	
Family income (MMW)	N=1,388	N=1,159	0.039 ^a	N=1,528	N=970	0.272 ^a
≤ 1	17.9	20.6		17.3	20.3	
1.1-3	42.4	42.3		41.6	40.6	
3.1-6	24.4	20.2		24.9	23.5	
> 6	15.3	16.9		16.2	15.6	
Gestational age (weeks)	N=1,391	N=1,159	0.321 ^a	N=1,539	N=1,050	0.002 ^a
< 34	1.2	2.0		1.2	2.9	
34-36	6.2	6.4		7.8	6.7	
37-40	75.8	76.1		77.2	79.3	
> 40	16.8	15.5		13.8	11.1	
Maternal nutritional status (BMI)	N=1,366	N=1,155	0.182 ^a	N=1,530	N=1,046	0.237 ^a
Low weight	10.4	9.1		8.0	7.8	
Adequate	67.3	69.7		67.6	71.3	
Overweight	17.9	15.7		19.4	16.5	
Obese	4.4	5.5		5.0	4.4	
Birth weight (grams)	N=1,407	N=1,188	0.017 ^a	N=1,559	N=1,078	<0.001 ^a
< 2500	7.5	10.1		10.9	10.6	
2500-2999	22.5	19.2		26.1	33.4	
3000-3999	64.0	63.3		59.2	53.6	
≥ 4000	6.0	7.4		3.8	2.4	
Length at birth (centimeters)	N=1,395	N=1,165	0.901 ^b	N=1,548	N=1,054	0.029 ^b
	49.1 (2.3)	49.1 (2.6)		48.5 (2.3)	48.3 (2.3)	
<i>15 years</i>						
Skin color	N=1,345	N=765	0.108 ^a	N=1,540	N=673	0.597 ^a
White	63.0	66.5		63.4	64.6	
Black, brown or other	37.0	33.5		36.6	35.4	
<i>18 years</i>						
Smoking habit	N=1,408	N=606	0.015 ^a	N=1,560	N=531	0.005 ^a
No	86.0	81.7		88.2	83.2	
Yes	14.0	18.3		11.8	16.8	

Variables	Men		<i>p</i> -value	Women		<i>p</i> -value
	Mean or median (SD or p25-p75); %			Mean or median (SD or p25-p75); %		
	Participants included N=1,408	Participants excluded ¹ N=1,195		Participants included N=1,560	Participants excluded ¹ N=1,085	
Total physical activity (min/week)	N=1,406 630.0 (300.0; 1,110.0)	N=602 592.5 (260.0; 1,140.0)	0.203 ^c	N=1,559 270.0 (110.0; 600.0)	N=528 280.0 (120.0; 600.0)	0.966 ^c
Total calcium consumption (mg)	N=1,406 674.8 (488.9; 939.4)	N=587 670.6 (479.5; 897.8)	0.282 ^c	N=1,559 638.1 (449.3; 922.1)	N=517 660.2 (477.4; 891.4)	0.656 ^c
Lean mass index (kg/m²)	N=1,408 18.0 (1.5)	N=493 18.0 (1.7)	0.281 ^b	N=1,560 14.0 (1.4)	N=390 14.3 (1.6)	0.002 ^b
Fat mass index (kg/m²)	N=1,408 4.1 (2.9)	N=493 4.5 (3.5)	0.012 ^b	N=1,560 8.3 (3.5)	N=390 9.0 (3.9)	<0.001 ^b
Body mass index (kg/m²)	N=1,408 23.0 (3.6)	N=570 24.2 (5.5)	<0.001 ^b	N=1,560 23.2 (4.4)	N=449 24.6 (5.8)	<0.001 ^b
<i>22 years</i>						
Lean mass index (kg/m²)	N=1,408 18.2 (1.7)	N=133 18.0 (2.0)	0.185 ^b	N=1,560 14.3 (1.7)	N=217 14.8 (1.9)	<0.001 ^b
Fat mass index (kg/m²)	N=1,408 5.5 (3.4)	N=133 5.7 (4.0)	0.571 ^b	N=1,560 9.8 (4.1)	N=217 11.0 (5.0)	<0.001 ^b
Body mass index (kg/m²)	N=1,408 24.7 (4.2)	N=279 26.2 (6.7)	<0.001 ^b	N=1,560 25.1 (5.3)	N=315 27.3 (7.3)	<0.001 ^b
Whole body BMD (g/cm²)	N=1,408 1.3 (0.1)	N=139 1.2 (0.1)	0.041 ^b	N=1,560 1.2 (0.1)	N=221 1.2 (0.1)	0.532 ^b
Lumbar spine BMD (g/cm²)	N=1,408 1.2 (0.1)	N=164 1.2 (0.2)	0.542 ^b	N=1,560 1.2 (0.1)	N=220 1.2 (0.1)	0.886 ^b
Femoral neck BMD (g/cm²)	N=1,408 1.2 (0.2)	N=164 1.2 (0.2)	0.187 ^b	N=1,560 1.0 (0.1)	N=220 1.0 (0.1)	0.355 ^b
<i>Outcome changes (Δ) at 18-22 years*</i>						
Whole body BMD change (g/cm²)	N=1,408 0.04 (0.02; 0.07)	N=12 0.04 (0.01; 0.05)	0.174 ^c	N=1,560 0.02 (0.01; 0.04)	N=10 0.04 (0.02; 0.06)	0.241 ^c
Lumbar spine BMD change (g/cm²)	N=1,406 0.06 (0.02; 0.10)	N=62 0.05 (0.01; 0.09)	0.514 ^c	N=1,558 0.04 (0.01; 0.07)	N=32 0.04 (0.01; 0.07)	0.980 ^c
Femoral neck BMD change (g/cm²)	N=1,407 0.01 (-0.05; 0.06)	N=59 0.02 (-0.04; 0.07)	0.486 ^c	N=1,547 0.01 (-0.03; 0.05)	N=43 0.02 (-0.02; 0.10)	0.412 ^c

N: Number of observations; SD: standard deviation; %: percentage; MMW: monthly minimum wages; BMI: body mass index; BMD: bone mineral density (g/m²).

*Changes in measurement of BMD at 22y – at 18y.

¹ Participants excluded from the analyses due to loss of follow-up or missing data;

^a *P* value refers to Chi-squared heterogeneity test;

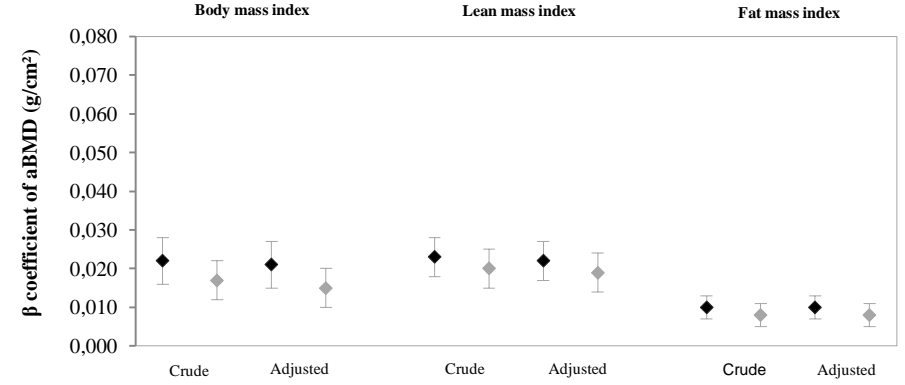
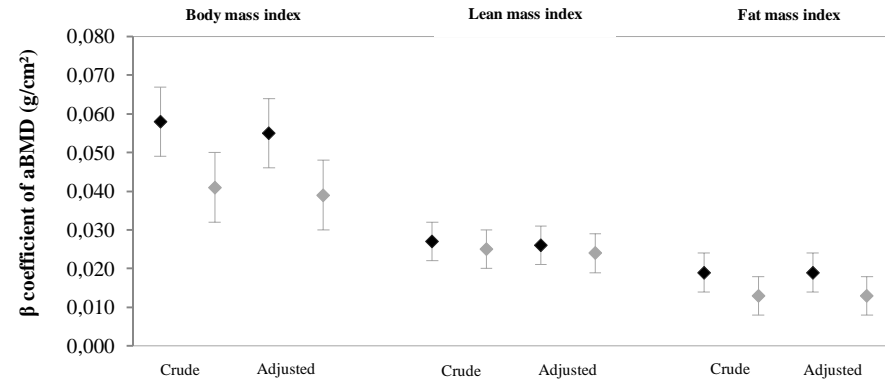
^b *P* value refers to Student's *t*-test;

^c *P* value refers to Wilcoxon Rank Sum Test.

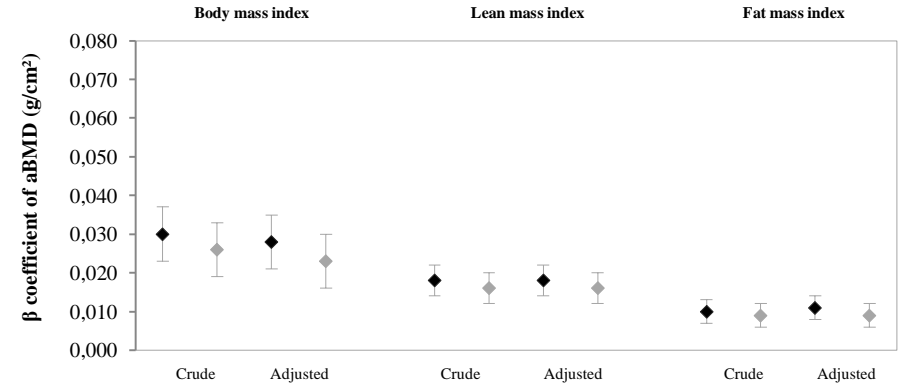
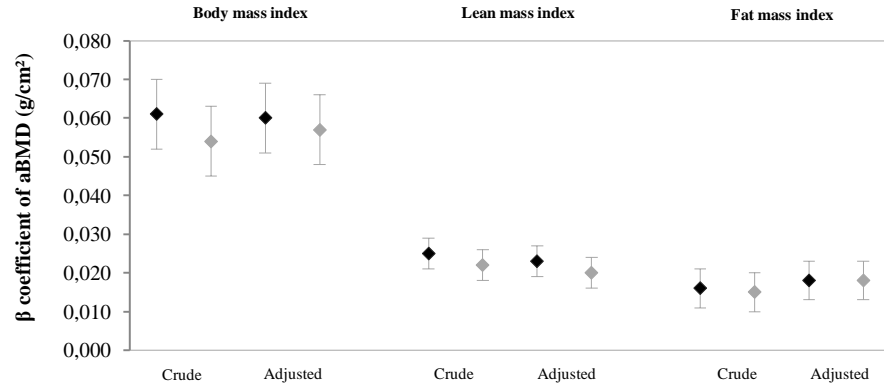
Whole Body

Men

Women



Lumbar Spine



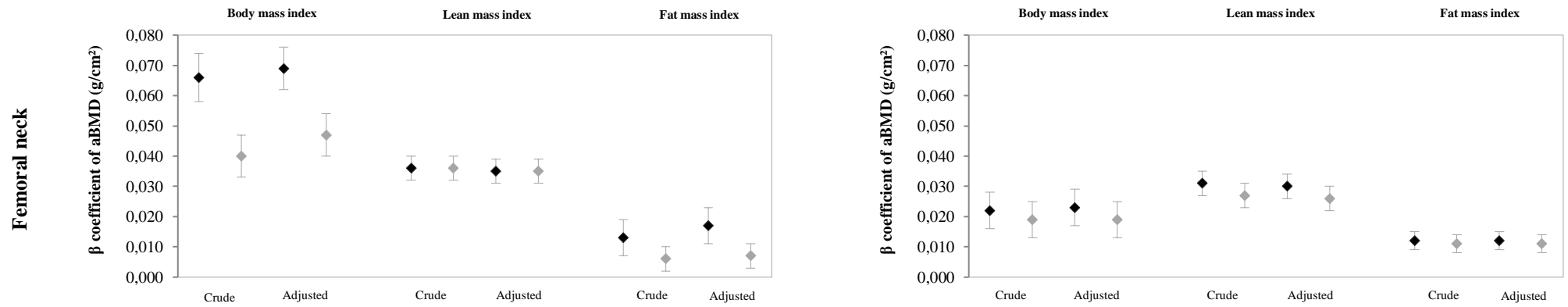


Figure 1. Association between body mass index, fat mass index and lean mass index (kg/m^2) at 18 and 22 years and bone mineral density (g/cm^2) at 22 years of age. The 1993 Birth Cohort, Pelotas, Brazil. (N=2,968)

- 1 ♦ Black symbols show crude and adjusted coefficients for the follow-up of 18 years and ♦ Grey symbols show crude and adjusted coefficients for the follow-up of 22 years of
- 2 age.
- 3 Adjusted for perinatal variables (maternal nutritional status, family income, maternal education, gestational age, birth weight, length at birth), 15 years (skin color) and 18 years
- 4 (smoking habit, total physical activity score, calcium intake).
- 5
- 6

7
8**Table 2.** Association between obesity according to Fat Mass Index (FMI) from 18 to 22 years on bone mineral density (g/cm²) at 22 years of age. The 1993 Birth Cohort, Pelotas, Brazil.

Variable	<i>Men (N=1,408)</i>						
	N	Whole Body		Lumbar Spine		Femoral Neck	
		Mean (95% CI)	Adjusted ¹ β (95% CI)	Mean (95% CI)	Adjusted ¹ β (95% CI)	Mean (95% CI)	Adjusted ¹ β (95% CI)
Obesity by FMI			0.332		0.140		0.088
Never	1,139	1.263 (1.257; 1.268)	Reference	1.232 (1.224; 1.241)	Reference	1.169 (1.159; 1.179)	Reference
Only at 18 years	28	1.297 (1.263; 1.331)	0.008 (-0.020; 0.005)	1.304 (1.251; 1.357)	0.007 (-0.016; 0.031)	1.188 (1.128; 1.249)	0.021 (-0.013; 0.055)
Only at 22 years	158	1.300 (1.286; 1.313)	0.002 (-0.004; 0.008)	1.249 (1.228; 1.270)	-0.007 (-0.017; 0.004)	1.204 (1.179; 1.228)	0.015 (-0.001; 0.030)
Always	83	1.313 (1.295; 1.331)	0.005 (-0.003; 0.012)	1.242 (1.216; 1.268)	-0.014 (-0.029; -0.001)	1.208 (1.175; 1.241)	0.018 (-0.003; 0.038)
Variable	<i>Women (N=1,560)</i>						
	N	Whole Body		Lumbar Spine		Femoral Neck	
		Mean (95% CI)	Adjusted ¹ β (95% CI)	Mean (95% CI)	Adjusted ¹ β (95% CI)	Mean (95% CI)	Adjusted ¹ β (95% CI)
Obesity by FMI			<0.001		0.339		0.001
Never	1,208	1.142 (1.138; 1.146)	Reference	1.185 (1.178; 1.192)	Reference	1.007 (1.000; 1.014)	Reference
Only at 18 years	23	1.183 (1.153; 1.212)	-0.013 (-0.023; -0.002)	1.239 (1.192; 1.285)	-0.005 (-0.027; 0.018)	1.036 (0.989; 1.083)	-0.014 (-0.042; 0.014)
Only at 22 years	182	1.192 (1.182; 1.202)	0.013 (0.009; 0.017)	1.228 (1.210; 1.247)	0.007 (-0.001; 0.016)	1.080 (1.063; 1.097)	0.027 (0.016; 0.038)
Always	147	1.236 (1.225; 1.248)	0.005 (0.001; 0.011)	1.286 (1.266; 1.305)	-0.001 (-0.012; 0.010)	1.129 (1.109; 1.149)	0.006 (-0.008; 0.019)

¹Adjusted for perinatal variables (maternal nutritional status, family income, maternal education, gestational age, weight and length), 15 years (skin color), 18 years (smoking, total physical activity score, calcium intake) and 22 years of age (lean mass index).

9

References

1. 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.
2. Hernandez CJ, Beaupré GS, Carter DR. A theoretical analysis of the relative influences of peak BMD, age-related bone loss and menopause on the development of osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2003;14(10):843-7.
3. Dimitri P. Fat and bone in children - where are we now? . *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2018;23(262-69).
4. Savvidis C, Tournis S, Dede AD. Obesity and bone metabolism. *Hormones.* 2018;17(2):205-17.
5. Hwang LC, Bai CH, Sun CA, Chen CJ. Prevalence of metabolically healthy obesity and its impacts on incidences of hypertension, diabetes and the metabolic syndrome in Taiwan. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2012;21(2):227–33.
6. Phillips CM, Dillon C, Harrington JM, McCarthy VJ, Kearney PM, Fitzgerald AP, et al. Defining metabolically healthy obesity: role of dietary and lifestyle factors. *PLoS One.* 2013;8(10):e76188
7. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet.* 2011;378(9793):804-14.
8. Wang CY, McPherson K, Marsh T, Gortmaker SL, Brown M. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet.* 2011;378(9793):815–25.
9. De Laet C, Kanis JA, Oden A, Johanson H, Johnell O, Delmas P, et al. Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2005;16(11):1330-8.
10. Lloyd JT, Alley DE, Hawkes WG, Hochberg MC, Waldstein SR, Orwig DL. Body mass index is positively associated with bone mineral density in US older adults. *Arch Osteoporos.* 2014;9:175.
11. Mosca LN, Goldberg TB, Da Silva VN, Da Silva CC, Kurokawa CS, Bisi Rizzo AC, et al. Excess body fat negatively affects bone mass in adolescents. *Nutrition.* 2014;30(7-8):847-52.

12. Winther A, Dennison E, Ahmed LA, Furberg AS, Grimnes G, Jorde R, et al. The Tromso study: fit futures: a study of Norwegian adolescents' lifestyle and bone health. *Arch Osteoporos*. 2014;9(1):185.
13. Leonard MB, Shults J, Wilson BA, Tershakovec AM, Zemel BS. Obesity during childhood and adolescence augments bone mass and bone dimensions. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(2):514-23.
14. Mosca LN, Da Silva VN, Goldberg TB. Does excess weight interfere with bone mass accumulation during adolescence? . *Nutrients*. 2013;5(6):2047-61.
15. Kim J, Kwon H, Heo BK, Joh HK, Lee CM, Hwang SS, et al. The Association between Fat Mass, Lean Mass and Bone Mineral Density in Premenopausal Women in Korea: A Cross-Sectional Study. *Korean J Fam Med*. 2018;39(2):74-84.
16. Ho-Pham LT, Nguyen UD, Nguyen TV. Association Between Lean Mass, Fat Mass, and Bone Mineral Density: A Meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(1):30-8.
17. Sioen I, Lust E, De Henauw S, Moreno LA, Jiménez-Pavón D. Associations Between Body Composition and Bone Health in Children and Adolescents: A Systematic Review. *Calcif Tissue Int*. 2016;99(6):557-77.
18. Dimitri P, Bishop N, Walsh JS, Eastell R. Obesity is a risk factor for fracture in children but is protective against fracture in adults: a paradox. *Bone*. 2012;50(2):457-66.
19. Weaver CM, Gordon CM, Janz KF, Kalkwarf HJ, Lappe JM, Lewis R, et al. The National Osteoporosis Foundation's position statement on peak bone mass development and lifestyle factors: a systematic review and implementation recommendations. *Osteoporos Int*. 2016;27(4):1281-386.
20. Wey HE, Binkley TL, Beare TM, Wey CL, Specker BL. Cross-sectional versus longitudinal associations of lean and fat mass with pQCT bone outcomes in children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(1):106-14.
21. Compston JE, Watts NB, Chapurlat R, Cooper C, Boonen S, Greenspan S, et al. Obesity is not protective against fracture in postmenopausal women: GLOW. *Am J Med United States*. 2011;124(11):1043-50.
22. Janicka A, Wren TA, Sanchez MM, Dorey F, Kim PS, Mittelman SD, et al. Fat mass is not beneficial to bone in adolescents and young adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(1):143-47.

23. Russell M, Mendes N, Miller KK, Rosen CJ, Lee H, Klibanski A, et al. Visceral fat is a negative predictor of bone density measures in obese adolescent girls. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(2):1247-55.
24. Dolan E, Swinton PA, Sale C, Healy A, O'Reilly J. Influence of adipose tissue mass on bone mass in an overweight or obese population: systematic review and meta-analysis. *Nutrition Reviews.* 2017;75(10):858-70.
25. Victora CG, Hallal PC, Araújo CLP, Menezes AMB, Wells JCK, Barros FC. Cohort Profile: The 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. *International Journal of Epidemiology.* 2008;37:704-9.
26. Gonçalves H, Assunção MCF, Wehrmeister FC, Oliveira IO, Barros FC, Victora CG, et al. Cohort Profile update: The 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort follow-up visits in adolescence. *International Journal of Epidemiology.* 2014:1-7.
27. Gonçalves H, Wehrmeister FC, Assunção MCF, Tovo-Rodrigues L, Oliveira IO, Murray J, et al. Cohort Profile Update: The 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort follow-up at 22 years. *International Journal of Epidemiology.* 2017:1-7.
28. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzales N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap) - A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform.* 2009;42(2): 377-81.
29. Habicht JP. Estandartización de métodos epidemiológicos cuantitativos sobre el terreno. *Bol Oficina Sanit Panam.* 1974;76:375-84.
30. Kelly TL, Wilson KE, Heymsfield SB. Dual Energy X-Ray Absorptiometry Body Composition Reference Values from NHANES. *PLoS ONE.* 2009;4(9):e7038.
31. Leonard MB, Elmi A, Mostoufi-Moab S, Shults J, Burnham JM, Thayu M, et al. Effects of sex, race, and puberty on cortical bone and the functional muscle bone unit in children, adolescents, and young adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(4):1681-8.
32. Alswat KA. Gender Disparities in Osteoporosis. *J Clin Med Res.* 2017;9(5):382-7.
33. Bachrach LK. Acquisition of optimal bone mass in childhood and adolescence. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12(1):22-8.
34. Berger C, Goltzman D, Langsetmo L, Joseph L, Jackson S, Kreiger N, et al. Peak bone mass from longitudinal data: implications for the prevalence, pathophysiology, and diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2010;25(9):1948-57.

35. Matkovic V, Jelic T, Wardlaw GM, Ilich JZ, Goel PK, Wright JK, et al. Timing of peak bone mass in Caucasian females and its implication for the prevention of osteoporosis. Inference from a cross-sectional model. *J Clin Invest.* 1994;93(2):799-808.
36. Høiberg M, Nielsen TL, Wraae K, Abrahamsen B, Hagen C, Andersen M, et al. Population-based reference values for bone mineral density in young men. *Osteoporos Int.* 2007;18(11):1507-14.
37. Henry MJ, Pasco JA, Korn S, Gibson JE, Kotowicz MA, Nicholson GC. Bone mineral density reference ranges for Australian men: Geelong Osteoporosis Study. *Osteoporos Int.* 2010;21:909-17.
38. Ribom EL, Ljunggren O, Mallmin H. Use of a Swedish T-score reference population for women causes a two-fold increase in the amount of postmenopausal Swedish patients that fulfill the WHO criteria for osteoporosis. *J Clin Densitom.* 2008;11(3):404-11.
39. Bachrach LK, Hastie T, Wang MC, Narasimhan B, Marcus R. Bone mineral acquisition in healthy Asian, Hispanic, black, and Caucasian youth: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(12):4702-12.
40. Mein AL, Briffa NK, Dhaliwal SS, Price RI. Lifestyle influences on 9-year changes in BMD in young women. *J Bone Miner Res.* 2004;19(7):1092-98.
41. Lloyd T, Petit MA, Lin HM, Beck TJ. Lifestyle factors and the development of bone mass and bone strength in young women. *J Pediatr.* 2004;144(6):776-82.
42. Walsh JS, Henry YM, Fatayerji D, Eastell R. Lumbar spine peak bone mass and bone turnover in men and women: a longitudinal study. *Osteoporos Int.* 2009;20(3):355-62.
43. Lu J, Shin Y, Yen MS, Sun SS. Peak Bone Mass and Patterns of Change in Total Bone Mineral Density and Bone Mineral Contents From Childhood Into Young Adulthood. *J Clin Densitom.* 2016;19(2):180-91.
44. Seeman E, Hopper JL, Young NR, Formica C, Goss P, Tsalamandris C. Do genetic factors explain associations between muscle strength, lean mass, and bone density? A twin study. *Am J Physiol* 1996;270(2 Pt 1):E320-7.
45. Nguyen TV, Howard GM, Kelly PJ, Eisman JA. Bone mass, lean mass, and fat mass: same genes or same environments? *Am J Epidemiol.* 1998;147(1):3-16.
46. Lang TF. The bone-muscle relationship in men and women. *J Osteoporos.* 2011;2011:702735.

47. Johansson H, Kanis JA, Odén A, McCloskey E, Chapurlat RD, Christiansen C, et al. A Meta-Analysis of the Association of Fracture Risk and Body Mass Index in Women. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2013;29(1):223-33.
48. Viljakainen HT, Valta H, Lipsanen-Nyman M, Saukkonen T, Kajantie E, Andersson S, et al. Bone Characteristics and Their Determinants in Adolescents and Young Adults with Early-Onset Severe Obesity. *Calcif Tissue Int*. 2015;97(4):364-75.
49. Petit MA, Beck TJ, Hughes JM, Lin HM, Bentley C, Lloyd T. Proximal femur mechanical adaptation to weight gain in late adolescence: a six-year longitudinal study. *J Bone Miner Res*. 2008;23(2):180-88.
50. Sayers A, Tobias JH. Fat mass exerts a greater effect on cortical bone mass in girls than boys. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(2):699-706.
51. Vandewalle S, Taes Y, Van Helvoirt M, Debode P, Herregods N, Ernst C, et al. Bone size and bone strength are increased in obese male adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(7):3019-28.
52. Dimitri P, Wales JK, Bishop N. Adipokines, bone-derived factors and bone turnover in obese children; evidence for altered fat-bone signalling resulting in reduced bone mass. *Bone*. 2011;48(2):189-96.
53. Kawai M, De Paula FJ, Rosen CJ. New insights into osteoporosis: The bone-fat connection. *J Intern Med*. 2012;272(4):317-29.
54. Reid IR. Fat and bone. *Arch Biochem Biophys*. 2010;503(1):20-7.
55. Hamrick MW, Ferrari SL. Leptin and the sympathetic connection of fat to bone. *Osteoporos Int*. 2008;19(7):905-12.
56. Braun T, Schett G. Pathways for bone loss in inflammatory disease. *Curr Osteoporos Rep*. 2012;10(2):101-8.
57. Farr JN, Dimitri P. The Impact of Fat and Obesity on Bone Microarchitecture and Strength in Children. *Calcif Tissue Int*. 2017;100(5):500-13.
58. Laddu DR, Farr JN, Laudermilk MJ, Lee VR, Blew RM, Stump C, et al. Longitudinal relationships between whole body and central adiposity on weight-bearing bone geometry, density, and bone strength: a pQCT study in young girls. *Arch Osteoporos*. 2013;8:156.
59. Burrows M, Baxter-Jones A, Mirwald R, Macdonald H, McKay H. Bone mineral accrual across growth in a mixedethnic group of children: are Asian children disadvantaged from an early age? . *Calcif Tissue Int*. 2009;84(5):366-78.

60. Kim KM, Lim S, Oh TJ, Moon JH, Choi SH, Lim JY, et al. Longitudinal Changes in Muscle Mass and Strength, and Bone Mass in Older Adults: Gender-Specific Associations Between Muscle and Bone Losses. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2018;73(8):1062-69.
61. Zhu K, Hunter M, James A, Lim EM, Walsh JP. Associations between body mass index, lean and fat body mass and bone mineral density in middle-aged Australians: The Busselton Healthy Ageing Study. *Bone.* 2015;74:146-52.
62. Jiang Y, Zhang Y, Jin M, Gu Z, Pei Y, Meng P. Aged-Related Changes in Body Composition and Association between Body Composition with Bone Mass Density by Body Mass Index in Chinese Han Men over 50-year-old. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130400.
63. Lekamwasam S, Weeraratna T, Rodrigo M, Arachchi WK, Munidasa D. Association between bone mineral density, lean mass, and fat mass among healthy middle-aged premenopausal women: a cross-sectional study in southern Sri Lanka. *J Bone Miner Metab.* 2009;27(1):83-8.
64. Alissa EM, Alnahdi WA, Alama N, Ferns GA. Relationship between nutritional profile, measures of adiposity, and bone mineral density in postmenopausal Saudi women. *J Am Coll Nutr.* 2014;33(3):206-14.

Artigo 3

Growth from birth to adolescence and bone mineral density in young adults:

The 1993 Pelotas Birth Cohort

Formatado para submissão à BMC Public Health

Normas: <https://bmcpublihealth.biomedcentral.com/submission-guidelines/preparing-your-manuscript/research-article>

**Growth from birth to adolescence and bone mineral density in young
adults: The 1993 Pelotas Birth cohort**

Growth and bone density

Isabel Oliveira Bierhals^{1*}

E-mail: isabelbierhals@gmail.com

Maria Cecília Formoso Assunção²

E-mail: cecilia.epi@gmail.com

Juliana dos Santos Vaz²

E-mail: juliana.vaz@gmail.com

Paula Duarte de Oliveira²

E-mail: pauladuartedeoliveira@gmail.com

Ana Maria Baptista Menezes²

E-mail: anamene.epi@gmail.com

Christian Loret de Mola²

E-mail: chlmz@yahoo.com

Helen Gonçalves²

E-mail: hdgs.epi@gmail.com

Fernando César Wehrmeister²

E-mail: fcwehrmeister@gmail.com

Caroline Costa²

E-mail: carolinercosta@gmail.com

Fernando Celso Barros³

E-mail: fcbarros.epi@gmail.com

¹ MSc. Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas - Pelotas, RS, Brazil.

² PhD. Postgraduate Program in Epidemiology, Federal University of Pelotas - Pelotas, RS, Brazil.

³ PhD. Postgraduate Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas -Pelotas, RS, Brazil.

***Corresponding author:** Rua Marechal Deodoro, 1160 – 3º andar, Pelotas/RS, 96020-220, Brazil. Phone: + 55-53-32841300.

E-mail: isabelbierhals@gmail.com

Abstract

Background: The study examined the association of body size (weight and length) at birth and gain in height and weight during childhood and adolescence with areal bone mineral density (aBMD) in adulthood for women and men.

Methods: 756 members (335 men and 421 women) of the 1993 Pelotas (Brazil) Birth cohort were studied. Data on weight and length/height were obtained at birth and subsequent follow-ups at 1, 4, 11, 15, 18, and 22 years of age and specific z scores were calculated by sex. The outcome was whole body aBMD (g/cm²) measured at 22 years of age using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). The effects of exposures, weight and length/height gain, were analyzed using conditional relative weight (CWh) and conditional length/height (CH). Linear regression models were adjusted for multiple confounders, including mother's educational level, family income, maternal smoking during pregnancy, gestational age, breastfeeding and skin color.

Results: In the adjusted models, among men greater height gain at 4, 11, and 18 years of age was associated with higher whole body aBMD, and the result with greatest magnitude was at 11 years of age (β 0.018 g/cm²; 95%CI 0.006; 0.030). Among women, aBMD was associated with height gain at all assessments from 1 to 15 years, with greatest effect size at 4 years of age (β 0.017 g/cm²; 95%CI 0.007; 0.027). Regarding to body weight, among men, greater weight at 4 and 15 years were associated with higher aBMD, with the highest coefficients for 15 years of age (β 0.015 g/cm²; 95%CI 0.003; 0.027); for women, except at birth, all weight gain variables were associated with aBMD and the highest coefficients were observed at 4 years (β 0.025 g/cm²; 95%CI 0.015; 0.035).

Conclusions: In this birth cohort, height and weight gain, especially from 4 to 15 years have important positive implications for aBMD to early adulthood.

Keywords: Cohort study, Young adults, Growth, Bone mineral density, Dual-Energy X-ray Absorptiometry.

Background

Bone mineral density (BMD) is used as a tool for the diagnosis of osteoporosis.¹⁻⁴ Each standard deviation of reduction in BMD is associated with a two to threefold increase in the risk of fracture among adults and the elderly.^{5, 6} Throughout life, bone mass quantity and quality are determined by an array of genetic and environmental factors and are also dependent on prior experiences such as nutritional status, calorie intake, physical activity, and hormone levels.¹ As such, it has been proposed that the determinant factors of bone mineral mass in advanced age are to be found in the initial stages of development in early life.⁷

The anthropometric phenotype comprises a set of partially modifiable influences on bone strength.² The foundation of bone strength is laid in utero, and subsequent growth in infancy, childhood, and adolescence is essential for the acquisition of adult peak bone mass.⁸ The increased overall exposure to weight during growth, in dose and/or duration, may positively influence bone health as a consequence of greater and/or longer exposure to loading, especially from the lean component.⁹ Many studies have consistently demonstrated a positive correlation between birth weight and bone mass,^{8, 10-15} supporting the intrauterine programming hypothesis. Prospective studies examining the high rate of height and weight growth trajectory in relation to bone mass in adults and the elderly have identified postnatal growth as an important determinant, particularly as predictive of future bone phenotype^{7, 16, 17} and risk of fracture.^{18, 19}

The term growth is employed to refer to changes over time in any of the body's measurements.²⁰ Assessment of human growth requires observations in series,²⁰ collecting longitudinal data with the objective of estimating periods of development with sensitivity for a given outcome.²¹ For example, investigations that enable study of possible relationships between growth and bone health at later ages are useful for evaluating whether preventative measures implemented at certain ages could improve bone health in the elderly.⁷

Recent investigations have discussed the fact that body size (height and weight) at the time of bone measurement is recognized as having a great deal of influence on bone mineral mass.^{7, 16, 17} Results demonstrate that the associations between growth and bone mass are attenuated when analyses are adjusted for

these variables, indicating that the majority of influence possibly resides in skeleton envelope size.^{7, 17}

The majority of studies investigating childhood growth and bone health or risk of fractures in adults have concentrated on associations between birth weight or weight at 1 year of age and bone phenotype.¹⁷ To date, few studies have examined the entire growth trajectory in relation to bone mass in adults, including prepubescent, pubescent, and postpubescent periods.^{7, 16, 17} However, those studies assessed outcomes in populations that were older than this cohort¹⁶ or even elderly^{7, 17} and some analyses were not stratified by sex.¹⁶ Since this study identified associations already present at 22 years of age, studying these relationships at earlier ages could help delay or avoid exacerbation of bone loss.

Therefore, considering both prior and contemporary factors that influence people's BMD, we examine the effects of body size at birth and growth in length/height and weight at different points during childhood and adolescence on the BMD in early adulthood of members of a birth cohort.

Methods

1993 Pelotas Birth Cohort

In 1993, all maternity units located in the city of Pelotas, RS, Brazil, were visited daily and 5,265 births to women living in the urban zone of Pelotas were recorded from January 1 to December 31.²² A total of 5,249 mothers agreed to take part in the study and their newborn infants were examined. The members of this cohort were followed up at several different times. More details on the methodology employed have been published elsewhere.²²

This study analyzes data from seven follow-ups: perinatal and at the ages of 1, 4, 11, 15, 18, and 22 years. Follow-ups at 1 year and 4 years of age were conducted with a subsample of the original cohort. For both of these follow-ups, the same children comprised the target population (n=1,460), which were a subset made up of all children born with low birth weight (n=510) and a random sample of 20% of the children who had not been born with low birth weight (n=950). More details on follow-ups have been described elsewhere.²²⁻²⁴ Home visits were conducted at each follow-up except for those at 18 and 22 years of age, when the subjects attended the university's research clinic, where they were

interviewed to complete digital questionnaires, underwent physical examinations, and had biological samples taken.^{23, 24} The last follow-up employed a questionnaire tested in advance that was constructed using the REDCap system (Research Electronic Data Capture)²⁵ for electronic data collection followed by construction of a database.

All of the follow-ups of the 1993 Pelotas Birth Cohort were approved by the Ethics Committee in Research of the School of Medicine of the Universidade Federal de Pelotas. The most recent protocol approved is number 1.250.366. At all stages of follow-up, participants (or their legal guardians) signed free and informed consent forms. Verbal consent was given for the perinatal phase.

Assessment of the outcome

Whole body areal bone mineral density (aBMD) (g/cm²) was measured using a dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) scanner (Lunar Prodigy Advance – GE®), calibrated daily. In accordance with the manufacturer's recommendations, pregnant women or those with a suspicion of pregnancy, people in wheelchairs, with bone and joint deformities, weight exceeding 120 kg, or height greater than 192 cm were not examined. During the examinations and for standardization, participants were given appropriate clothing and did not wear anything made from metal.

Assessment of exposures

Birth weight and length were recorded at the maternity units at birth. At follow-up visits, measurements were taken at participants' homes and at the 18 and 22-year follow-ups measurements were taken at the research clinic. On every occasion, weight and length or height were measured by professionals who had been trained according to Lohman's²⁶ techniques and standardized as proposed by Habicht²⁷.

Growth patterns were studied at several points of life: infancy (from birth to 1 year of age), early and mid-childhood (1-4 and 4-11 years of age, respectively) and early and late adolescence (11-15 and 15-18 years of age, respectively). For each age interval, the effects of weight gain and linear growth were analyzed using conditional relative weight (CWh) and conditional length/height (CH) as proposed by Adair et al.²⁸ CWh considers current height and previous weights,

lengths, or heights and CH considers previous weight and length or height measurements, but not current weight.²⁸

To enable calculation of conditional measures, first, specific z scores were calculated by sex for each weight and length from prior follow-ups. The z score measures (weight or height) for a given age were regressed on the z-scores of all previous measurements using linear regressions. The conditional measure is represented by the standardized residuals of the regression and indicates the extent to which a participant's measurements deviate from the expected, on the basis of prior growth and the cohort's mean growth. It can be interpreted as a measure of how much more quickly or more slowly weight or length/height change over the course of a period of time. For example, an adolescent with a positive CWh value from 4 to 11 years of age gained more weight relative to his or her own previous weights and lengths/heights in relation to all the other members of the cohort. Since the conditional variables are not correlated, they can be included in a multiple regression model without violating any assumptions of colinearity.²⁹

Covariates

The following were analyzed: sex (male, female), mother's educational level (0-4, 5-8, 9-11, ≥ 12 years of study), family income (≤ 1 ; 1.1-3; 3.1-6; >6 times the minimum wage), maternal smoking during pregnancy (yes; no), gestational age (<34 , 34-36, 37-40, >40 weeks) total breastfeeding duration (months), self-report skin color collected at 15 years of age (white; black; brown; or other) and weight (kg) and height (meters) collected at 22 years of age.

Statistical analysis

All statistical analyses were conducted using Stata 12.1® (Stata Corp., College Station, Texas, United States) and stratified by sex, because there is evidence to show that bone mass varies by sex, and an interaction test was significant ($p < 0.1$). Descriptive analysis was based on calculation of relative frequencies and their respective 95% confidence intervals (95%CI) to compare sample subsets comprising participants included and excluded from the analyses (because of losses to follow-up, deaths, or missing data).

Associations between aBMD and conditional growth were analyzed using linear regression and p values were obtained using the Wald test. Results were standardized to enable direct comparisons between regression coefficients. This analysis was conducted with adjusted for mother's educational level, family income, maternal smoking during pregnancy, gestational age, breastfeeding, and skin color. Variables were included in the regressions according to a full adjusted model, irrespective of the level of significance of association with the outcome in bivariate analysis.

Nonlinearity of the relationship between z-scores for each age and bone outcome was evaluated using fractional polynomials. This was followed by visual inspection of dispersion graphs. The linear relationships were considered adequate in all cases except for the variable weight at 18 years of age for males and weight at 11 and 15 years of age for females. The categorical analyses for these variables are shown in the Supplementary Table.

Since the first two follow-ups assessed a subset comprising all births with birth weight <2500g and a 20% subsample of the remaining children, results were weighted to reproduce the original distribution of the cohort.

Results

At 22 years of age, 3,810 individuals were followed-up (a follow-up rate of 76.3%). Of these, 3,328 cohort members had BMD data, 756 of whom comprised the sample analyzed for this study because they had complete weight and height data from all six previous follow-ups and for the confounding variables used for adjustment.

Table 1 describes the participants included in and excluded from the analyses (because of losses to follow-up, death, or missing data), stratified by sex. A total of 421 (55.7%) members of the sample were women. Significant differences between those included and those excluded were observed among the women, for the variables breastfeeding and skin color and gestational age for both sexes.

According to Figure 1, illustrating the association between CH and aBMD, for men, greater height gain at 4, 11, and 18 years of age was associated with higher whole body aBMD after adjustment for possible confounding factors. The greatest magnitude of increase in aBMD was observed for those who had

greatest height gain at 11 years of age (β 0.018 g/cm²; 95%CI 0.006; 0.030), followed by gain at 4 years of age (β 0.016 g/cm²; 95%CI 0.005; 0.027), and 18 years of age (β 0.012 g/cm²; 95%CI 0.002; 0.022). Among the women, aBMD was associated with height gain observed at 1, 4, 11, and 15 years of age. The greatest magnitude of increase in bone density was associated with gain at 4 years of age (β 0.017 g/cm²; 95%CI 0.007; 0.027), followed by weight gain at 1 (β 0.014 g/cm²; 95%CI 0.004; 0.024), 11 (β 0.013 g/cm²; 95%CI 0.004; 0.022), and 15 years of age (β 0.010 g/cm²; 95%CI 0.001; 0.019).

Figure 2 describes the effect of CWh on whole body aBMD at 22 years of age. For men, in the adjusted analysis, higher aBMD was observed for those with greater weight gain at 4 (β 0.014 g/cm²; 95%CI 0.002; 0.026) and at 15 (β 0.015 g/cm²; 95%CI 0.003; 0.027). With relation to the women, with the exception of birth weight, all of the other weight gain variables were associated with greater bone mass, with highest coefficients for 4 (β 0.025 g/cm²; 95%CI 0.015; 0.035), 11 (β 0.022 g/cm²; 95%CI 0.013; 0.031), and 15 years of age (β 0.020 g/cm²; 95%CI 0.010; 0.030).

Discussion

We described associations between height and weight gain at different stages of growth and aBMD in young adult members of a birth cohort. Overall, we observed that greater CH in childhood and adolescence (4, 11, and 18 years of age for men and 1, 4, 11, and 15 years of age for women) was positively associated with aBMD at 22 years of age. With regard to CWh, greater birth weight and weight gain recorded at 4 and 15 years of age among men and at all measurement points except birth in the women, were associated with greater aBMD in early adulthood.

These findings suggest that aBMD is influenced by different critical periods. However, certain methodological challenges interfere with conclusive identification of effects over time,³⁰ such as, for example, when growth measurements are widely separated in time it is difficult to identify the exact growth period of greatest influence.³¹ Furthermore, there is also the unknown influence of growth realignment after a previous period of unalignment,³⁰ as is seen among children born with high or low birth weights and lengths, which are

frequently compensated by catch-up or catch-down growth during the first 2 years of life.^{30, 32}

Tandon et al. assessed a birth cohort in New Delhi, India, at four points in time (birth, 0-2, 2-11, and 11-adult), finding that greater early growth in length/height (0-2, 2-11, and 11-adult) was associated with higher aBMD at the neck of the femur, the lumbar spine, and the left forearm in adulthood (33-39 years of age), with higher coefficients observed for individuals who gained length/height between 0 and 2 years of age.¹⁶ A study of a subset of elderly women from the Helsinki birth cohort, with assessments at birth and of growth at 0-2, 2-7, and 7-11 years of age, only observed associations between height gain at 0-2 and 2-7 years of age and bone area and bone mineral content (BMC) at the neck of the femur, but even these associations lost significance after adjustment for current height.⁷ Kuh et al., analyzed data from a British birth cohort, assessing height gain at the ages of 2-4, 4-7, and 7-15 and weight at 0-2, 2-4, 4-7, 7-15, 15-20, 20-36, and 36-64 years of age, and found that men who had grown most rapidly in height from 4 to 7 years of age had higher hip BMD at 60 to 64 years of age. With regard to weight, they observed positive associations for gains at 2-4 and 4-7 years of age and at the follow-ups in adulthood among men and an effect that started later among women (at all follow-ups from 7 to 15 years of age)¹⁷.

Some studies have adjusted their analysis models for weight and height variables at the time of bone mass measurement. They suggested that when one observes the disappearance of associations or accentuated attenuation of coefficients after inclusion of these variables, most of the influence lies in the size of the skeletal envelope achieved by adulthood, rather than mineralization.^{7, 16, 17} However, growth in height during childhood cannot be ignored because, for example, it is the primary predictor of adult height and, consequently, to a great extent determines the size of the adult skeleton and its respective bone mass.^{7, 16} Nevertheless, it is impossible to answer to what extent these correlations between growth, size of the adult body, and bone properties are caused by genes in common that regulate these phenotypes or to adaptations of growth and bone development during childhood, in response to environmental factors.⁷

It could thus be argued that height, weight, or body mass index (BMI) early on in life do not provide more information on mass and bone density than can be

obtained by knowing adult height, weight, and BMI. However, knowing the early trajectories of weight and height enables estimation of future bone mass and bone density.¹⁶

Our analyses showed that height gain between 4 and 11 years and weight gain from 4 to 15 years are the most important periods for the accumulation of bone mass. Adolescence is a crucial period in development of the skeleton during which approximately half of bone mass is accumulated.³⁴ Bone mass is acquired at a relatively slow rate throughout childhood. With onset of puberty and the increase in adolescents' growth in height, accumulation of bone mineral mass is rapid, reaching a peak soon after peak height gain. For whole body bone mineral mass, peak bone mineral accrual occurs at 12.5 ± 0.90 years of age in girls and 14.1 ± 0.95 years of age in boys.³⁵ There is some evidence to support the idea of tracking both for BMC and BMD during growth and maturation. Some studies show that BMC and BMD for the whole body, the hips and the spine measured during prepubescence and postpubescence are correlated ($r=0.54-0.81$) with measures obtained 7 to 8 years later.³⁶⁻³⁸

The principal strength of our study is the reliability of the longitudinal weight and height data recorded by trained researchers at all study points. Some limitations should be mentioned. Our study was limited to 18.2% of the original cohort considering that the follow-ups at 1 and 4 years of age were restricted to a subset. However, the baseline characteristics of the subsample were similar to the participants of the main cohort. Long periods between the measurement time points is another limitation in the current study (e.g. 4-11 years). While DXA is the gold-standard method for measurement of bone mass and density, it is subject to certain limitations. Assessment of BMD by DXA without the aid of computed tomography prevents us from assessing other factors that impact on bone strength, such as cortical porosity and thickness, trabecular microstructure and bone geometry.³⁹ These factors in combination contribute to defining the biomechanical properties of bone tissue, such as rigidity and load supported.⁴⁰ Additionally, increased adiposity is associated with greater measurement error and sometimes with underestimation of bone density because of variability of detection of the interface between soft tissue and bone.⁴¹ On the other hand, the ideal measurement is not possible in many population research scenarios.

In conclusion, we demonstrated positive associations between weight and length/weight gain over the course of life and aBMD in young adults of both sexes, with greater evidence especially from 4 to 15 years.

Table 1. Characteristics of the cohort members according to inclusion in the conditional height/weight for age analyses, stratified by sex. The 1993 Pelotas Birth Cohort, Brazil.

Variables	Men		Women	
	Participants included N=335	Participants excluded ¹ N=2,268	Participants included N=421	Participants excluded ¹ N=2,224
	% (95%CI)		% (95%CI)	
Family income (MMW)				
≤ 1	18.3 (14.1; 22.5)	19.2 (17.6; 20.9)	18.7 (14.9; 22.4)	18.5 (16.8; 20.1)
1.1-3	44.2 (38.8; 49.5)	42.1 (40.0; 44.1)	43.1 (38.3; 47.8)	41.0 (38.9; 43.1)
3.1-6	21.6 (17.1; 26.1)	22.7 (20.9; 24.4)	23.4 (19.4; 27.5)	24.5 (22.7; 26.3)
> 6	15.9 (12.0; 19.9)	16.0 (14.5; 17.6)	14.8 (11.4; 18.3)	16.0 (14.5; 17.6)
Maternal education (years)				
0-4	25.7 (21.0; 30.5)	27.3 (25.4; 29.1)	25.7 (21.5; 29.9)	29.5 (27.6; 31.4)
5-8	49.7 (44.3; 55.1)	46.1 (44.1; 48.2)	49.3 (44.5; 54.1)	45.2 (43.2; 47.3)
9-11	16.8 (12.7; 20.8)	18.3 (16.7; 19.9)	19.0 (15.3; 22.8)	16.8 (15.2; 18.3)
≥ 12	7.8 (4.9; 10.7)	8.3 (7.2; 9.4)	6.0 (3.7; 8.2)	8.5 (7.3; 9.6)
Maternal smoking in pregnancy				
No	67.8 (62.7; 72.8)	67.6 (65.7; 69.5)	64.1 (59.5; 68.7)	65.9 (63.9; 67.9)
Yes	32.2 (27.2; 37.3)	32.4 (30.5; 34.3)	35.9 (31.3; 40.5)	34.1 (32.1; 36.1)
Gestational age				
< 34	3.0 (1.2; 4.9)	1.3 (0.8; 1.8)	2.9 (1.3; 4.5)	1.7 (1.1; 2.2)
34-36	13.6 (9.9; 17.3)	5.2 (4.3; 6.1)	14.7 (11.3; 18.1)	5.9 (4.9; 6.9)
37-40	71.1 (66.2; 76.0)	76.7 (75.0; 78.5)	70.6 (66.2; 75.0)	79.5 (77.8; 81.2)
> 40	12.3 (8.8; 15.9)	16.8 (15.2; 18.3)	11.8 (8.7; 14.9)	12.9 (11.5; 14.3)
Total duration of breastfeeding (months)				
0.01-1.0	22.4 (17.9; 26.9)	27.5 (21.5; 33.5)	20.7 (16.8; 24.6)	26.0 (19.5; 32.4)
1.01-3.0	30.2 (25.2; 35.1)	33.5 (27.2; 39.8)	26.0 (21.7; 30.2)	37.0 (29.9; 44.1)
3.01-6.0	18.2 (14.1; 22.4)	18.3 (13.2; 23.5)	18.1 (14.4; 21.8)	10.5 (6.0; 15.0)
6.01-12.0	12.8 (9.2; 16.4)	9.2 (5.3; 13.0)	12.6 (9.4; 15.8)	9.9 (5.5; 14.3)
>12	16.4 (12.4; 20.4)	11.5 (7.2; 15.7)	22.6 (18.6; 26.6)	16.6 (11.1; 22.0)
Skin color				
White	63.9 (58.7; 69.1)	64.4 (62.2; 66.6)	59.4 (54.7; 64.1)	64.8 (62.6; 67.1)
Black, brown or other	36.1 (30.9; 41.3)	35.6 (33.4; 37.8)	40.6 (35.9; 45.3)	35.2 (32.9; 37.4)
	Mean (95%CI)		Mean (95%CI)	
Areal bone mineral density (g/cm²) at 22 years	1.27 (1.26; 1.28)	1.27 (1.26; 1.28)	1.15 (1.15; 1.16)	1.16 (1.15; 1.16)

N: Number of observations; %: percentage; MMW: monthly minimum wages.

¹ Participants excluded from the analyses due to loss of follow-up, death or missing data.

Results were weighted to reproduce the original cohort distribution, considering the early follow-ups included all births <2500g and a 20% sample of the remaining children.

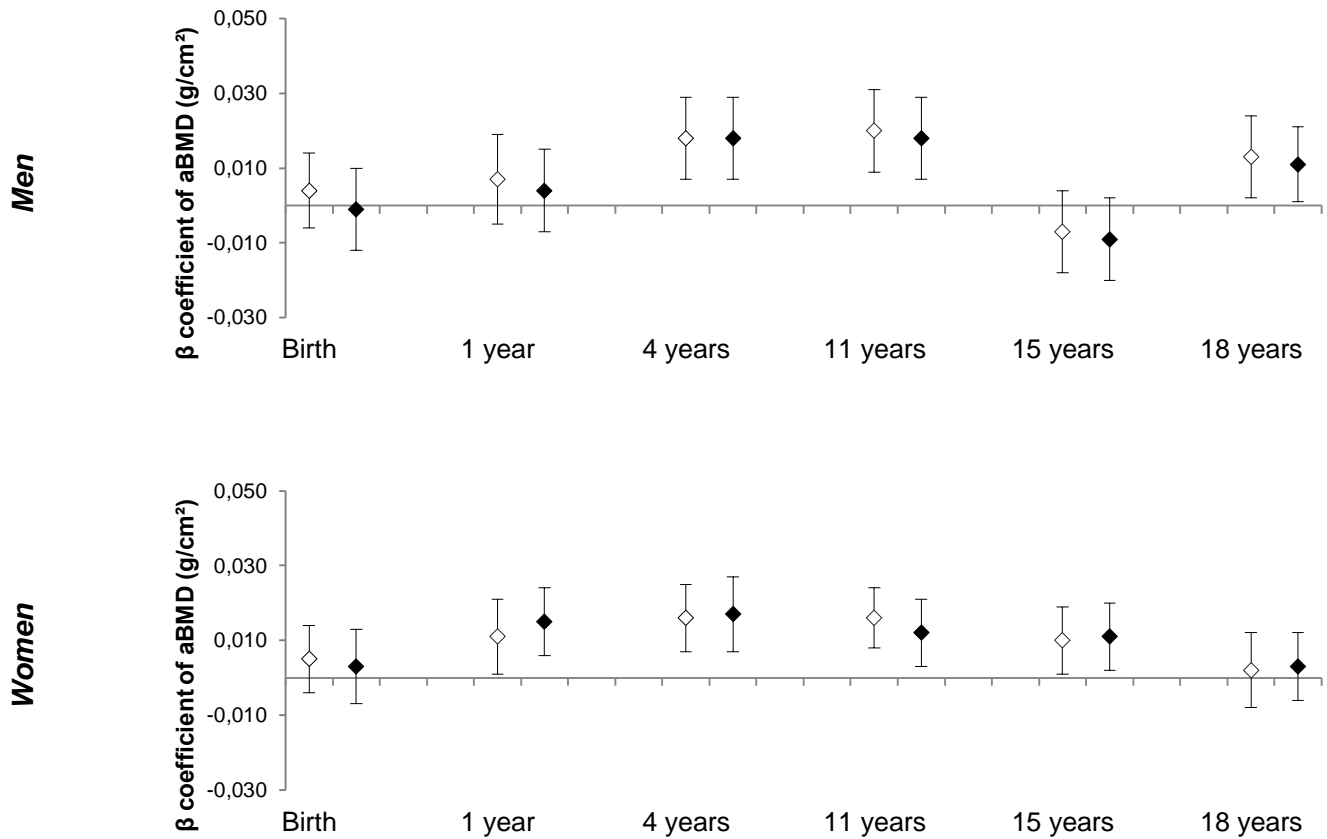


Figure 1. Regression coefficients and 95% confidence intervals for areal bone mineral density (aBMD) (g/cm²) at 22 years of age according periods of length/height conditional growth. White symbols show crude coefficients and black symbols show adjusted coefficients. The model was adjusted for family income at birth, maternal education, maternal smoking during pregnancy, gestational age, breastfeeding and skin color. For the variable at birth, adjustment for breastfeeding was not included.

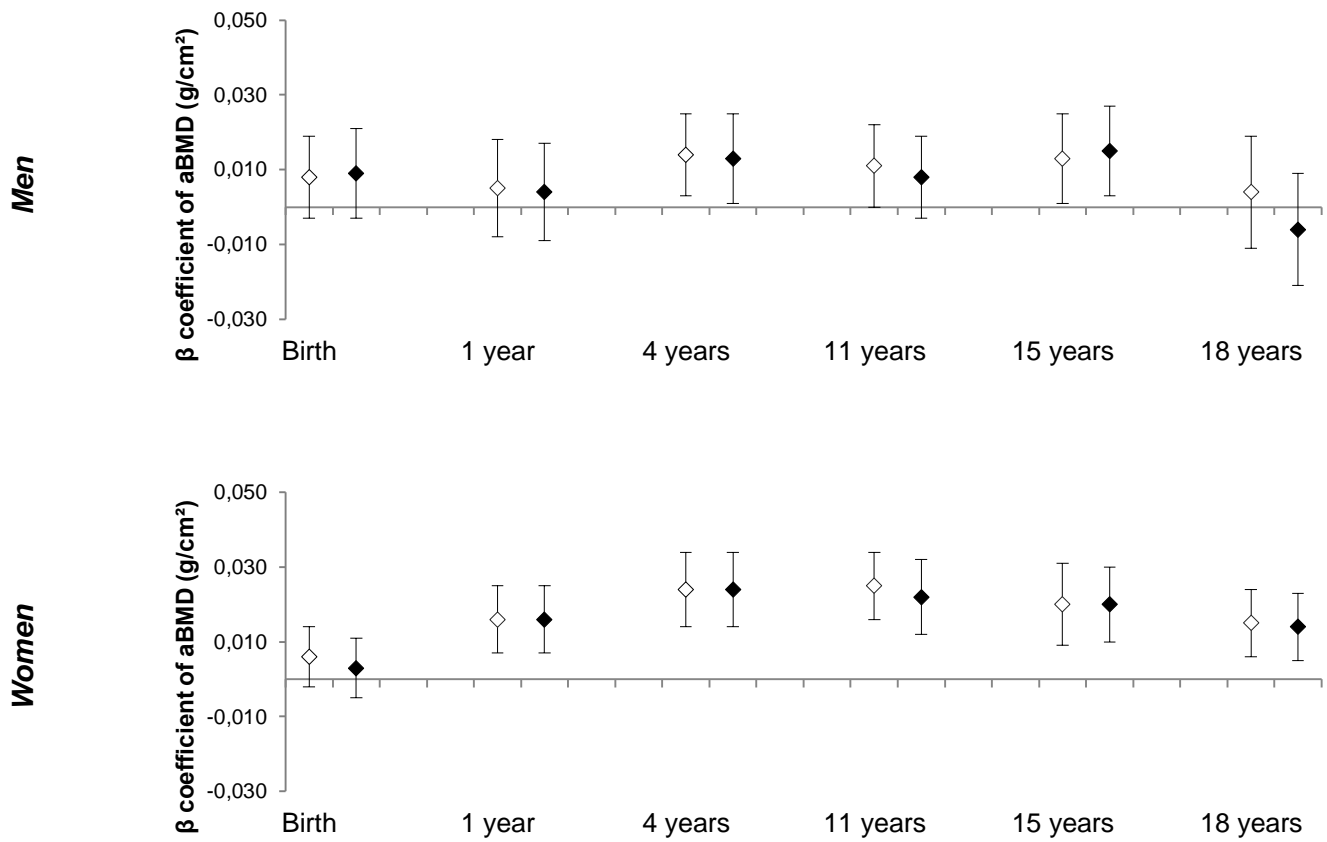


Figure 2. Regression coefficients and 95% confidence intervals for areal bone mineral density (aBMD) (g/cm²) at 22 years of age according to periods of relative weight conditional growth. White symbols show crude coefficients and black symbols show adjusted coefficients. The model was adjusted for family income at birth, maternal education, maternal smoking during pregnancy, gestational age, breastfeeding and skin color. For the variable at birth, adjustment for breastfeeding was not included.

Supplementary Table

Table 1. Bone mineral density at 22 years according to conditional relative weight for age in men at 18 years and in women at 11 and 15 years of age. The 1993 Pelotas Birth Cohort, Brazil.

Conditional weight for age (z-score)	BMD Whole body (g/cm ²)		
	Crude Regression Coefficient (95% CI)	Adjusted Regression Coefficient ¹ (95% CI)	Adjusted Regression Coefficient ² (95% CI)
<i>Men</i>			
At 18 years	<i>p</i> <0.001	<i>p</i> =0.001	<i>p</i> =0.516
≤ -1	Ref.	Ref.	Ref.
-0.99 a -0.01	-0.017 (-0.066; 0.031)	-0.016 (-0.064; 0.032)	-0.001 (-0.041; 0.040)
0.00 a 0.99	0.041 (-0.009; 0.091)	0.039 (-0.010; 0.088)	0.036 (-0.005; 0.077)
≥ 1	0.061 (0.011; 0.111)	0.055 (0.004; 0.106)	0.013 (-0.031; 0.057)
<i>Women</i>			
At 11 years	<i>p</i> <0.001	<i>p</i> =0.001	<i>p</i> =0.674
≤ -1	Ref.	Ref.	Ref.
-0.99 a -0.01	-0.017 (-0.045; 0.012)	-0.022 (-0.051; 0.007)	-0.011 (-0.036; 0.015)
0.00 a 0.99	0.018 (-0.012; 0.048)	0.013 (-0.018; 0.043)	-0.005 (-0.031; 0.021)
≥ 1	0.057 (0.023; 0.092)	0.052 (0.017; 0.087)	0.002 (-0.025; 0.029)
At 15 years	<i>p</i> =0.001	<i>p</i> =0.001	<i>p</i> =0.136
≤ -1	Ref.	Ref.	Ref.
-0.99 a -0.01	0.009 (-0.019; 0.036)	0.009 (-0.019; 0.037)	0.023 (0.002; 0.045)
0.00 a 0.99	0.010 (-0.020; 0.039)	0.010 (-0.020; 0.041)	0.021 (-0.002; 0.044)
≥ 1	0.073 (0.035; 0.112)	0.075 (0.036; 0.113)	0.030 (-0.001; 0.061)

¹Adjusted for family income at birth, maternal education, maternal smoking during pregnancy, breastfeeding and skin color.

²Adjusted for family income at birth, maternal education, maternal smoking during pregnancy, breastfeeding, skin color and current height.

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):337-47.
2. Harvey N, Dennison E, Cooper C. Osteoporosis: a lifecourse approach. *J Bone Miner Res*. 2014;29(9):1917-25.
3. Lupsa BC, Insogna K. Bone Health and Osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2015;44(3):517-30.
4. Sheu A, Diamond T. Bone mineral density: testing for osteoporosis. *Aust Prescr* 2016;39(2):35-9.
5. Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ*. 1996;312(7041):1254-9.
6. Curtis EM, Harvey NC, D'Angelo S, Cooper CS, Ward KA, Taylor P, et al. Bone mineral content and areal density, but not bone area, predict an incident fracture risk: a comparative study in a UK prospective cohort. *Arch Osteoporos*. 2016;11(1):39.
7. Mikkola TM, von Bonsdorff MB, Osmond C, Salonen MK, Kajantie E, Cooper C, et al. Childhood growth predicts higher bone mass and greater bone area in early old age: findings among a subgroup of women from the Helsinki Birth Cohort Study. *Osteoporos Int*. 2017;28(9):2717-22.
8. Dennison EM, Syddall HE, Sayer AA, Gilbody HJ, Cooper C. Birth weight and weight at 1 year are independent determinants of bone mass in the seventh decade: the Hertfordshire cohort study. *Pediatr Res*. 2005;57(4):582-6.
9. Moon RJ, Cole ZA, Crozier SR, Curtis EM, Davies JH, Gregson CL, et al. Longitudinal changes in lean mass predict pQCT measures of tibial geometry and mineralisation at 6-7 years. *Bone*. 2015;75:105-10.
10. 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(1):17-21.
11. Yarbrough DE, Barrett-Connor E, Morton DJ. Birth weight as a predictor of adult bone mass in postmenopausal women: the Rancho Bernardo Study. *Osteoporos Int*. 2000;11(7):626-30.

12. Antoniadou L, MacGregor AJ, Andrew T, Spector TD. Association of birth weight with osteoporosis and osteoarthritis in adult twins. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42(6):791-6.
13. te Velde SJ, Twisk JWR, van Mechelen W, Kemper HCG. Birth weight and musculoskeletal health in 36-year-old men and women: results from the Amsterdam Growth and Health Longitudinal Study. *Osteoporos Int.* 2004;15(5):382-8.
14. Jones G, Dwyer T. Birth weight, birth length, and bone density in prepubertal children: evidence for an association that may be mediated by genetic factors. *Calcif Tissue Int.* 2000;67(4):304-8.
15. Oliver H, Jameson KA, Sayer AA, Cooper C, Dennison EM, The Hertfordshire Cohort Study Group. Growth in early life predicts bone strength in late adulthood: The Hertfordshire Cohort Study. *Bone.* 2007;41(3):400-5.
16. Tandon N, Fall CH, Osmond C, Sachdev HP, Prabhakaran D, Ramakrishnan L, et al. Growth from birth to adulthood and peak bone mass and density data from the New Delhi Birth Cohort. *Osteoporos Int.* 2012;23(10):2447-59.
17. Kuh D, Wills AK, Shah I, Prentice A, Hardy R, Adams JE, et al. Growth from birth to adulthood and bone phenotype in early old age: a British birth cohort study. *J Bone Miner Res.* 2014;29(1):123-33.
18. Cooper C, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C, Tuomilehto J, Barker DJ. Maternal height, childhood growth and risk of hip fracture in later life: a longitudinal study. *Osteoporos Int.* 2001;12(8):623-9.
19. Javaid MK, Eriksson JG, Kajantie E, Forsen T, Osmond C, Barker DJ, et al. Growth in childhood predicts hip fracture risk in later life. *Osteoporos Int.* 2011;22(1):69-73.
20. Johnson W. Analytical strategies in human growth research. *Am J Hum Biol.* 2015;27(1):69-83.
21. Adair LS, Martorell R, Stein AD, Hallal PC, Sachdev HS, Prabhakaran D, et al. Size at birth, weight gain in infancy and childhood, and adult blood pressure in 5 low- and middle-income-country cohorts: when does weight gain matter? *Am J Clin Nutr.* 2009;89(5):1383-92.

22. Victora CG, Hallal PC, Araújo CLP, Menezes AMB, Wells JCK, Barros FC. Cohort Profile: The 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. *International Journal of Epidemiology*. 2008;37:704-09.
23. Gonçalves H, Assunção MCF, Wehrmeister FC, Oliveira IO, Barros FC, Victora CG, et al. Cohort Profile update: The 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort follow-up visits in adolescence. *International Journal of Epidemiology*. 2014:1-7.
24. Gonçalves H, Wehrmeister FC, Assunção MCF, Tovo-Rodrigues L, Oliveira IO, Murray J, et al. Cohort Profile Update: The 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort follow-up at 22 years. *International Journal of Epidemiology*. 2017:1-7.
25. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzales N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap) - A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform*. 2009;42(2):377-81.
26. Lohman T, Roche A, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign (IL): Human Kinetics Books; 1988.
27. Habicht JP. Estandartización de métodos epidemiológicos cuantitativos sobre el terreno. *Bol Oficina Sanit Panam*. 1974;76:375-84.
28. Adair LS, Fall CH, Osmond C, Stein AD, Martorell R, Ramirez-Zea M, et al. Associations of linear growth and relative weight gain during early life with adult health and human capital in countries of low and middle income: findings from five birth cohort studies. *Lancet*. 2013;382(9891):525-34.
29. Keijzer-Veen MG, Euser AM, van Montfoort N, Dekker FW, Vandenbroucke JP, Van Houwelingen HC. A regression model with unexplained residuals was preferred in the analysis of the fetal origins of adult diseases hypothesis. *J Clin Epidemiol*. 2005;58(12):1320-4.
30. Heppe DH, Medina-Gomez C, de Jongste JC, Raat H, Steegers EA, Hofman A, et al. Fetal and childhood growth patterns associated with bone mass in school-age children: the Generation R Study. *J Bone Miner Res*. 2014;29(12):2584-93.
31. Jensen RB, Vielwerth S, Frystyk J, Veldhuis J, Larsen T, Mølgaard C, et al. Fetal growth velocity, size in early life and adolescence, and prediction of bone mass: association to the GH-IGF axis. *J Bone Miner Res*. 2008;23(3):439-46.

32. Taal HR, Vd Heijden AJ, Steegers EA, Hofman A, Jaddoe VW. Small and large size for gestational age at birth, infant growth, and childhood overweight. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21(6):1261-8.
33. MacKinnon DP, Krull JL, Lockwood CM. Equivalence of the Mediation, Confounding and Suppression Effect. *Prev Sci*. 2000;1(4):173-81.
34. Parfitt AM. Genetic effects on bone mass and turnover-relevance to black/white differences. *J Am Coll Nutr*. 1997;16(4):325-33.
35. Mitchell PJ, Cooper C, Dawson-Hughes B, Gordon CM, Rizzoli R. Life-course approach to nutrition. *Osteoporos Int*. 2015;26(12):2723-42.
36. Cheng S, Völgyi E, Tyllavsky FA, Lyytikäinen A, Törmäkangas T, Xu L, et al. Trait-specific tracking and determinants of body composition: a 7-year follow-up study of pubertal growth in girls. *BMC Med*. 2009;7:5.
37. Ferrari SL, Chevalley T, Bonjour JP, Rizzoli R. Childhood fractures are associated with decreased bone mass gain during puberty: an early marker of persistent bone fragility? *J Bone Miner Res*. 2006;21(4):501-7.
38. 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.
39. Sornay-Rendu E, Boutroy S, Munoz F, Delmas PD. Alterations of cortical and trabecular architecture are associated with fractures in postmenopausal women, partially independent of decreased BMD measured by DXA: the Ofely Study. *J Bone Miner Res*. 2007;22(3):425-33.
40. Liu XS, Zhang XH, Sekhon KK, Adams MF, McMahon DJ, Bilezikian JP. High-resolution peripheral quantitative computed tomography can assess microstructural and mechanical properties of human distal tibial bone. *J Bone Miner Res*. 2010;25(4):746-56.
41. Yu EW, Thomas BJ, Brown JK, Finkelstein JS. Simulated increases in body fat and errors in bone mineral density measurements by DXA and QCT. *J Bone Miner Res*. 2012;27(1):119-24.

List of abbreviation

aBMD: areal bone mineral density

BMD: Bone mineral density

BMC: Bone mineral content

BMI: Body mass index

CH: Conditional length/height

CWh: Conditional relative weight

DXA: dual-energy X-ray absorptiometry

REDCap: Research Electronic Data Capture

Declarations

Ethics approval and consent to participate

All the follow-ups of the 1993 Pelotas Birth Cohort Study were approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Pelotas Medical School under permit number 1.250.366. At all stages, the participants (or their legal guardians) signed an informed consent form.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Source of Funding

From 2004 to the last follow-up, 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.

Role of Founding Source

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. The 22-year follow-up was supported by the Science and Technology Department/Brazilian Ministry of Health, with resources transferred through the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), grant 400943/2013-1.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Author contributions

I. O. B., F. C. B. and M. C. F. A. designed research; I. O. B. performed statistical analyses; I. O. B, J. S. V, P. D. O. and M. C. F. A. wrote the paper. J. S. V., M. C. F. A., P. D. O., C. L. M., F. C. B., H. G., F. C. W., A. M. B. M. and C. C. reviewed all the drafts of the manuscript and contributed with suggestions to the work. I. O. B., J. S. V., F. C. B. and M. C. F. A. had primary responsibility for final content. 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. The 22-year follow-up was supported by the Science and Technology Department/Brazilian Ministry of Health, with resources transferred through the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), grant 400943/2013-1.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

NOTA À IMPRENSA

Consumo alimentar, composição corporal e o crescimento de um indivíduo na adolescência afetam a saúde óssea. Estudos sugerem que, ao longo da vida, a quantidade e qualidade da massa óssea são determinadas por fatores genéticos e ambientais e também dependem de experiências anteriores, como estado nutricional, consumo alimentar, atividade física e níveis hormonais. Neste sentido, é proposto que a massa óssea em idade avançada pode ser determinada na infância e adolescência, podendo resultar em um risco aumentado de fratura e osteoporose. A aluna do Programa de Pós-graduação em Epidemiologia da Universidade Federal de Pelotas, Isabel Oliveira Bierhals, com orientação das professoras Maria Cecília Assunção e Juliana Vaz, avaliou em sua tese os possíveis efeitos da alimentação, da composição corporal e do crescimento em diferentes fases da infância e adolescência, sobre a massa óssea no início da idade adulta com dados da Coorte de 1993 de Pelotas. Em relação ao consumo de leite dos 18 aos 22 anos de idade, observou-se que homens que aumentaram ou diminuíram o consumo nesse período, apresentaram menor massa mineral óssea, ou seja, essa menor quantidade óssea pode ser consequência da oscilação do consumo. Quando foi analisado o consumo de cálcio proveniente dos alimentos, observou-se que as mulheres que aumentaram o consumo deste mineral dos 18 aos 22 anos tiveram maior quantidade óssea. E, as análises da alimentação dos indivíduos como um todo mostraram que a diminuição do consumo de um padrão alimentar rico em cafeína e pobre em vitamina D foi associada a um aumento na massa óssea, no início da vida adulta. Quando a relação entre a composição corporal (massa magra e massa gorda) e a massa óssea foi estudada, observou-se que o maior responsável pelo aumento da massa óssea é a quantidade de massa magra que o indivíduo tem no seu corpo. Já em relação ao crescimento, o ganho de peso e altura da infância ao início da idade adulta apresentou importantes implicações para a massa óssea no início da idade adulta.