

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**ANÁLISE DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS
FOSFATASE ALCALINA ÓSSEA ESPECÍFICA E
DEOXIPIRIDINOLINA NO METABOLISMO ÓSSEO DE
RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO SUBMETIDOS À
FISIOTERAPIA MOTORA**

TESE DE DOUTORADO

CARINE MORAES VIGNOCHI

Porto Alegre
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**ANÁLISE DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS
FOSFATASE ALCALINA ÓSSEA ESPECÍFICA E
DEOXIPIRIDINOLINA NO METABOLISMO ÓSSEO DE
RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO SUBMETIDOS À
FISIOTERAPIA MOTORA**

CARINE MORAES VIGNOCHI

A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de doutor.

Orientador: Rita de Cássia Silveira
Co-Orientador: Renato S. Procianoy

Porto Alegre, Brasil
2011

V686a Vignochi, Carine Moraes

Análise dos marcadores bioquímicos fosfatase alcalina óssea específica e deoxipiridinolina no metabolismo ósseo de recém-nascidos pré-termo submetidos a fisioterapia motora / Carine Moraes Vignochi ; orient. Rita de Cássia Silveira. – 2010.

115 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Osteopenia 2. Prematuro 3. Fisioterapia 4. Marcadores bioquímicos
I. Silveira, Rita de Cássia II. Título.

NLM: WS 270

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

18/04/2011

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Beatriz Junqueira Pereira Paim

Universidade Luterana do Brasil

Prof. Dr. Paulo Antonacci Carvalho

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Luciana Friedrich

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DEDICATÓRIA

À minha querida avó Doralina... E a todas as crianças acompanhadas, por representarem o motivo principal do empenho dedicado nesta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Rita de Cássia Silveira pela excelente orientação, oportunidade e ensinamentos.

Ao Dr. Ernani Miura, pelo acolhimento, apoio e orientação desde o início de minha pós-graduação.

Ao Dr. Renato Procianoy, por toda contribuição.

À Vânia Naomi Hirakata, pela competência e dedicação na análise estatística desta pesquisa.

À Rosane Blanguer, secretária do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, pelo carinho, apoio e disponibilidade durante o período de mestrado e doutorado.

Ao Dr. Luis Henrique Canani, pelos esclarecimentos e auxílio para escolha dos exames laboratoriais utilizados nesta pesquisa.

À Professora Dra. Carmem Pilla, pela disponibilidade para a realização dos exames laboratoriais envolvidos no presente estudo.

À equipe de médicos e enfermagem do Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), em especial à Dra. Clarissa Gutierrez Gonçalves.

À Maria do Horto, pelo carinho dedicado na revisão gramatical deste trabalho.

Ao Omero, meu esposo, que apoiou, auxiliou e esteve ao meu lado durante todo este trajeto.

E principalmente aos pacientes e seus pais, que possibilitaram esta pesquisa.

RESUMO

Introdução: Recém-nascidos prematuros hospitalizados costumam receber manuseio mínimo com objetivo de protegê-los de estresse. Como resultado desta inatividade pode ocorrer aumento da reabsorção óssea e desmineralização. **Objetivo:** Avaliar a formação óssea de recém-nascidos prematuros antes e após um protocolo de fisioterapia motora, por meio dos marcadores bioquímicos fosfatase alcalina óssea específica (FAO) e deoxipiridinolina urinária (DPID). **Método:** Ensaio clínico randomizado que incluiu 30 recém-nascidos com idades gestacionais de até 35 semanas e peso adequado para a idade gestacional randomizados em grupo controle (GC) e grupo fisioterapia (GF). No GF foi aplicado o protocolo de fisioterapia motora que consistiu de 15 minutos diários de movimentos passivos com compressões articulares suaves, cinco dias por semana. Diariamente foram obtidos dados sobre alimentação e peso corporal. FAO e DPID foram coletados na entrada e na alta hospitalar, em ambos os grupos. Foi realizado teste de ANCOVA para comparar as médias dos grupos. **Resultados:** No início do estudo a idade gestacional, a idade gestacional corrigida, o peso de nascimento e o gênero foram similares entre os grupos. Na oferta de nutrientes, tempo de uso de nutrição parenteral total e ventilação mecânica os grupos mostraram-se homogêneos. No GF o aumento nos níveis de FAO foi de $22,44 \pm 3,49$ U/L após a intervenção, ao passo que o GC apresentou aumento de $2,87 \pm 3,99$ U/L ($p=0,003$). No GF houve redução nos níveis de DPID de $28,21 \pm 11,05$ nmol/mmol, enquanto no GC houve aumento de $49,95 \pm 11,05$ nmol/mmol ($p<0,001$). **Conclusão:** Uma proposta de intervenção fisioterapêutica aplicada por meio de exercícios passivos e por um curto período de tempo (15 minutos), diariamente ao longo de quatro semanas, associada com adequada alimentação, resulta em efeitos favoráveis ao metabolismo ósseo dos recém-nascidos prematuros. Os benefícios da prevenção e do tratamento da doença metabólica óssea da prematuridade, além de uma alimentação adequada, devem incluir estes exercícios passivos com suaves compressões articulares a fim de melhorar a qualidade óssea do prematuro.

Palavras-chave: Prematuros. Marcadores bioquímicos. Fisioterapia. Osteopenia

ABSTRACT

Introduction: Preterm infants need minimal handling in order to protect them from stress, resulting in bone resorption and demineralization. **Objetives:** To evaluate bone formation in newborn preterm infants before and after a physical therapy protocol, by means of biochemical markers bone-specific alkaline phosphatase (BAP) and urinary deoxypyridinoline (DPD). **Method:** Randomized controlled clinical trials included 30 newborn preterm infants with gestational ages of 35 weeks or less and appropriate weight for gestational age were randomized into control group (CG) and physiotherapy group (PG). Physical therapy protocol consisted of 15 minutes of daily passive movements with gentle joint compression, five days a week. Daily data were obtained on feeding and body weight. BAP and DPD were collected before and after intervention in both groups. ANCOVA test was performed to compare the means of both groups. **Results:** At baseline, gestational age and corrected gestational age, birth weight and gender were similar between groups. The supply of nutrients, time of use of Total Parenteral Nutrition and mechanical ventilation were similar among groups. The increase of BAP levels for PG was 22.44 ± 3.49 U/L, whereas CG presented an increase of 2.87 ± 3.99 U/L ($p= 0.003$). There was a reduction on DPD levels for PG of 28.21 ± 11.05 nmol/mmol, and an increase of 49.95 ± 11.05 nmol/mmol ($p < 0.001$) in GC. **Conclusion:** Physiotherapy intervention results in beneficial effects to bone metabolism of preterm infants and should be included in the standard care of preterm infants.

Keywords: Preterm . Bone markers. Physiotherapy. Osteopenia.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS DA TESE

Tabela 1: Caracterização da amostra	50
Tabela 2: Ganho de peso e oferta de nutrientes	51
Tabela 3: Características da gestação	52
Tabela 4: Avaliação bioquímica do metabolismo ósseo prévia e após protocolo de fisioterapia em prematuros	54
Figura 1: Comparação entre médias do ganho em FAO no início e final do estudo.....	54
Figura 2: Comparação entre médias do ganho em DPID no início e final do estudo	55
Figura 3: Correlação Linear de Pearson entre ganho de peso e deoxipiridinolona	55

LISTA DE TABELAS E FIGURAS DOS ARTIGOS

ARTIGO VERSÃO EM PORTUGUÊS

Tabela 1: Caracterização da amostra	95
Tabela 2: Avaliação bioquímica do metabolismo ósseo prévio e após protocolo de fisioterapia em prematuros	96
Figura 1: Comparação entre as médias do ganho em FAO no início e final do estudo.....	97
Figura 2: Comparação entre as médias de ganho em DPID no início e final do estudo.....	97

ARTIGO VERSÃO EM INGLÊS

Table 1: Sample Characterization	112
Table 2: Biochemical assessment of bone metabolism prior and after physiotherapy protocol in premature infants	113
Figure 1: Comparison between the mean gain in BAP in the beginning and end of the study	113
Figure 2: Comparison between the mean gains in DPD in the beginning and end of the study ...	114

LISTA DE ABREVIATURAS

AIG	Peso adequado para a idade gestacional
Ca	Cálcio
CMO	Conteúdo mineral ósseo
DMO	Densidade mineral óssea
DPID	Deoxipiridinolina urinária
FA	Fosfatase alcalina total
FAO	Fosfatase alcalina óssea específica
GC	Grupo de controle
GF	Grupo fisioterapia
ICTP	Telopectídeo carboxiterminal do colágeno tipo I
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
µl	Microlitro
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
DEXA	<i>Dual x-Ray absorptiometry</i>
Kg	Quilograma
NPT	Nutrição Parenteral total
P	Fósforo
PEPI	<i>Programs for Epidemiologists</i>
pH	Potencial hidrogênico
PICP	Fragmento carboxiterminal do pró-colágeno tipo 1
PID	Pipidinolina urinária
PIG	Pequeno para idade gestacional
PTH	Hormônio da paratireoide
RNs	Recém-nascidos
U/L	Unidade por litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 MINERALIZAÇÃO E CRESCIMENTO ÓSSEO INTRAUTERINO	13
2.1.1 Formação da matriz orgânica e inorgânica.....	13
2.1.2 Fatores hormonais	13
2.1.3 Fatores biomecânicos.....	14
2.2 DOENÇA ÓSSEA DE PREMATUROS	17
2.2.1 Histórico	17
2.2.2 Prevalência	17
2.2.3 Etiologia.....	19
2.2.4 Diagnóstico e gravidade.....	22
2.2.5 Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo.....	24
2.2.5.1 Fosfatase alcalina total	25
2.2.5.2 Fosfatase alcalina óssea específica	26
2.2.5.3 Piridinolina e deoxipiridinolina urinária.....	27
2.3 TRATAMENTO DA OSTEOPENIA DA PREMATURIDADE.....	29
2.3.1 Suplementação de minerais e vitaminas	30
2.3.2 Leite materno <i>versus</i> fórmulas na prevenção e tratamento da doença óssea metabólica.....	30
2.3.3 Efeitos da carga mecânica na mineralização.....	32
2.3.4 Fisioterapia motora e metabolismo ósseo de RNs	34
3 JUSTIFICATIVA	39
4 OBJETIVO GERAL	40
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40

5 HIPÓTESE	41
6 PACIENTES E MÉTODOS	42
6.1 DELINEAMENTO	42
6.2 LOCAL DE ESTUDO	42
6.3 POPULAÇÃO EM ESTUDO	42
6.4 POPULAÇÃO DA PESQUISA	42
6.5 AMOSTRA.....	43
6.5.1 Critérios de inclusão	43
6.5.2 Critérios de exclusão.....	43
6.6 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA	44
6.7 RANDOMIZAÇÃO.....	44
6.8 INTERVENÇÃO FISIOTERAPÊUTICA.....	44
6.9 VARIÁVEIS PRINCIPAIS.....	45
6.9.1 Fosfatase Alcalina Óssea específica: Marcador de Formação Óssea	45
6.9.2 Deoxipiridinolina Urinária: Marcador de Reabsorção Óssea.....	46
6.9.3 Peso corporal.....	46
6.10 REGISTRO DA OFERTA DE NUTRIENTES	46
6.11 EXAMES COMPLEMENTARES	47
6.12 INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES	47
6.13 CARACTERÍSTICAS MATERNAS	48
6.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
6.15 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	49
7 RESULTADOS.....	50
7.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	50
7.2 GANHO DE PESO E OFERTA DE NUTRIENTES.....	51
7.3 CARACTERÍSTICAS MATERNAS	51
7.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA	52

7.4.1 Fosfatase alcalina óssea específica	52
7.4.2 Deoxipiridinolina urinária.....	53
7.4.3 Exames complementares	53
8 DISCUSSÃO.....	56
CONCLUSÃO	61
9 REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO 1 - Formulário para registro de dados	75
ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	77
ARTIGO – VERSÃO EM PORTUGUÊS.....	79
ARTIGO – VERSÃO EM INGLÊS	98

1 INTRODUÇÃO

A interação entre a oferta de minerais, a atividade hormonal e a movimentação fetal é essencial para o apropriado desenvolvimento do esqueleto intrauterino (RODRIGUEZ *et al.*, 1992; FROST, 2001; KURL *et al.*, 2002; KOVACS & KRONENBERG, 2006). A nutrição pós-natal do recém-nascido prematuro procura melhorar a mineralização, não se igualando, no entanto, à oferta intrauterina de nutrientes. Para uma formação óssea extrauterina adequada são necessárias ofertas similares de cálcio (Ca) e fósforo (P) correspondentes ao terceiro trimestre gestacional. Entretanto, é difícil ofertar no ambiente extrauterino, através da alimentação, os níveis possíveis pela via placentária (DEMARINI *et al.*, 1997; RIGO *et al.*, 2000). Como consequência ocorrem aumento da fragilidade óssea e suscetibilidade para fraturas, além de distúrbios de crescimento, denominados osteopenia da prematuridade, que podem perdurar no decorrer da infância e da idade adulta (WEILER *et al.*, 2002; SCHOENAU & LAND, 2008; CHAN *et al.*, 2008; PETTERI *et al.*, 2009; FEWTRELL *et al.*, 2009).

O cuidado padrão de recém-nascidos (RNs) prematuros em unidades de terapia intensiva em geral consiste na restrição da estimulação sensorial e física como forma de manter a estabilidade e reduzir o estresse pós-natal (KUNH, 1991; LINGEN *et al.*, 2002). Os prematuros hospitalizados costumam receber, portanto, limitada estimulação motora. O resultado desta inatividade colabora para a inadequada estimulação do metabolismo ósseo (BOURRIN *et al.*, 1995; BISHOP, 1999; MILLER, 2003; VICKERS *et al.*, 2004; MACKELVIE *et al.*, 2004).

Existem evidências de que as forças mecânicas nos ossos estimulam a formação e o crescimento, enquanto a inatividade predispõe à reabsorção (BOURRIN *et al.*, 1995; LARSON, 2000). Estudos em crianças e adultos têm sugerido que programas de exercícios

regulares promovem melhor mineralização óssea e têm sido utilizados como parte do tratamento e da prevenção da osteopenia em diferentes estágios da vida, por induzir os osteoblastos a aumentarem sua atividade em resposta à sobrecarga mecânica (MCINTYRE *et al.*, 1992; MENKES *et al.*, 1993; ANDREOLI *et al.*, 2001; VICKERS *et al.*, 2004; RAUTAVA *et al.*, 2007; BAYRAMOGLU *et al.*, 2005; PITUKCHEEWANONT *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, pesquisadores têm sugerido que 5 minutos de estimulação passiva diária resultam em aumento de densidade mineral óssea (DMO) em RNs prematuros (MOYER-MILEUR *et al.*, 2000; NEMET *et al.*, 2002; LITMANOVITZ *et al.*, 2003). No entanto, de acordo com recente revisão sistemática, as evidências atuais ainda não suportam seu uso rotineiro, pois diferentes métodos de avaliação da mineralização óssea e problemas metodológicos limitam estes resultados (SCHULZKE *et al.*, 2010).

Nosso grupo de pesquisa publicou, em 2008, o efeito de 15 minutos de estimulação passiva ao dia, através de *dual X-ray absorptiometry* (DEXA) de corpo total. Os resultados demonstraram aumento de conteúdo mineral ósseo (CMO), fato que colabora na constatação de que o exercício passivo no pré-termo é um importante instrumento na mineralização óssea e na prevenção da osteopenia da prematuridade. Contudo, não foram avaliados marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo (VIGNOCHI *et al.*, 2008). Através da medida de CMO e DMO, podemos verificar, apenas, se existe menor quantidade óssea produzida em determinado momento. A análise bioquímica permite conhecer, de forma conjunta, se a falha na mineralização ocorreu por escassez de formação ou se houve reabsorção exacerbada. Propicia, portanto, avaliar de forma dinâmica as alterações ósseas mais recentes, antes de representarem perdas em gramas de mineral ósseo e se o desequilíbrio pode ser atenuado ou revertido pela intervenção fisioterapêutica (SARAIVA & LAZARETTI-CASTRO, 2002).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MINERALIZAÇÃO E CRESCIMENTO ÓSSEO INTRAUTERINO

2.1.1 Formação da matriz orgânica e inorgânica

O processo fisiológico de mineralização óssea representa a incorporação de minerais na matriz óssea orgânica (osteóide), após ter sido sintetizada e depositada através dos osteoblastos. Uma vez que a matriz é formada, são necessários mais 10 dias para mineralização (TERMINE & ROBEY, 1996; SHOENAU & LAND, 2008).

Ca e P são importantes para a mineralização óssea fetal e pós-natal. Os níveis de incorporação de Ca apresentam médias de 120 mg/kg/dia com 26 semanas de idade gestacional, 130-140 mg/kg/dia com 36 semanas e 150-155 mg/kg/dia com 36 a 38 semanas (RIGO *et al.*, 2000). A quantidade de massa óssea fetal, por sua vez, aumenta de 5 para 30 g entre a vigésima quarta e a trigésima sétima semana de gestação, sendo o terceiro trimestre responsável por 80% da produção óssea fetal (FORBES, 1976; GREER *et al.*, 1986).

2.1.2 Fatores Hormonais

Diversos fatores hormonais favorecem o processo de mineralização intrauterina:

- a produção placentária de $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}$, envolvida na regulação da produção de proteínas carreadoras de Ca;
- as baixas concentrações PTH, que limitam a mobilização mineral óssea;

- a presença de concentrações elevadas de calcitonina no período fetal, fase na qual parece desempenhar seu papel fisiológico mais importante, favorecendo a deposição mineral;
- a liberação do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I), que estimula o crescimento ósseo;
- os altos níveis de estrogênio circulantes no sangue materno, que favorecem a mineralização.

A associação dos fatores acima descritos resulta em aumento da formação óssea e diminuição da reabsorção, o que proporciona rápido ganho de conteúdo mineral durante o terceiro trimestre de gestação (MAYNE *et al.*, 1991; HILLMAN, 1996).

2.1.3 Fatores biomecânicos

Frost propôs o modelo da carga mecânica, que associa a força mecânica sobre o osso como fator importante no desenvolvimento da resistência óssea. O modelo atribui a mineralização adequada resultante da soma da nutrição, da ação hormonal e dos fatores biomecânicos. De acordo com esta teoria, determinada carga exerce uma força sobre o osso, que por sua vez é transmitida como um sinal para ativação dos osteoblastos e osteoclastos. Esta força pode ser um movimento, uma tensão (do tendão sobre o osso), uma compressão (longitudinal) ou ainda uma pressão ao redor do osso. Se houver uma compressão, mesmo que muito discreta, o osso sofrerá uma carga proporcional a ela, pois qualquer força exerce sempre uma carga, mesmo que muito pequena. Portanto, se há um aumento significativo no nível da carga gerada, os osteoblastos respondem com aumento de sua produção. Do contrário, se a carga for significativamente escassa, a ação do osteoblasto será reduzida (FROST, 1996).

Há dois tipos de carga para os ossos. O primeiro é associado com a carga direta ou com o impacto no osso por outro objeto, como o aumento da carga que os ossos das pernas recebem ao correr, ou a resistência experimentada pela água na natação. O segundo é associado com a movimentação ativa e passiva que os músculos promovem ao movimentar-se. A ação dos músculos é pequena, mas esta carga contínua é importante para a manutenção da densidade óssea (LARSON & HENDERSON, 2000; FROST, 2001).

De acordo com a teoria biomecânica, os ossos são formados em momentos distintos. O primeiro é a embriogênese do sistema esquelético. Entre 5 e 12 semanas de gestação, genes específicos direcionam o mesênquima para locais específicos que são destinados a ser precursores dos tecidos ósseos que serão condricificados e ossificados (LARSEM, 1998; FROST, 2001). Outros genes direcionam ventral e dorsalmente condensações mesodérmicas que serão precursoras dos músculos esqueléticos. Por volta da décima sexta semana de gestação, a anatomia, as relações anatômicas e o maquinário biológico responsável pela adaptação do osso já estão no lugar. Neste estágio há o que se chama de “condição basal” (LARSEM, 1998; FROST, 2001). O segundo estágio inicia na metade do segundo trimestre. O sistema esquelético fica responsivo às proteínas ósseas, aos mediadores humorais, aos fatores nutricionais e biomecânicos. Os ossos longos crescem em comprimento e em diâmetro. O crescimento linear dos ossos longos é determinado primariamente por genes específicos por meio da ossificação endocondral, entretanto assumem sua geometria final através do processo de modelamento. O crescimento em diâmetro de ossos longos ocorre por modelamento: os osteoclastos retiram osso endosteal e os osteoblastos formam osso sobre o perióstio. Ossos como a escápula e a pelve crescem por intermédio de formação intramembranosa. O modelamento, que é responsivo a carga, ocorre na formação óssea endocondral e intramembranosa, no período pré e pós-natal (LARSEM, 1998; FROST, 2001).

Durante o segundo e terceiro trimestre, o modelamento ósseo também responde ao aumento das forças musculares. Assim como o modelamento, o movimento fetal também se inicia na décima sexta semana de gestação. O movimento fetal promove carga óssea de três maneiras: com o impacto das extremidades do feto na parede uterina, com a resistência dos movimentos contra o líquido amniótico e com o desenvolvimento muscular normal e seus movimentos (FROST, 2001; MILLER, 2003).

Trabalhos realizados por Rodriguez e colaboradores reforçam a teoria biomecânica. Eles verificaram que crianças com doenças congênitas neuromusculares, nas quais há diminuição do movimento e da massa muscular fetais, tiveram osteopenia e redução de osso cortical de ossos longos comparados aos controles (RODRIGUES *et al.*, 1988). Esta observação sugere que há formação perióstea reduzida em crianças com doença neuromuscular pré-natal. O mesmo grupo de pesquisadores desenvolveu um estudo experimental em que fetos de ratos foram farmacologicamente imobilizados com curare aos 17 dias de gestação. Ao nascimento eles apresentaram osteopenia e cordão umbilical mais curto em relação aos controles, sendo este achado associado a uma redução do movimento fetal (RODRIGUES *et al.*, 1991; 1992).

2.2 DOENÇA ÓSSEA DE PREMATUROS

2.2.1 Histórico

Osteopenia pode ser descrita como uma doença óssea sistêmica caracterizada pela diminuição da massa e deterioração microarquitetônica do tecido ósseo, tipicamente associado com aumento da fragilidade óssea e suscetibilidade para fraturas (SCHOENAU & LAND, 2008). Há diminuição da densidade ou do número de trabéculas ósseas, ocasionando redução da densidade do córtex ósseo e da massa óssea por volume de tecido (RAUCH & SCHOENAU, 2002).

Inicialmente, as alterações de mineralização observadas nos RNs foram denominadas de osteopenia da prematuridade. Este termo foi utilizado para caracterizar a situação na qual se observava um quadro de hipomineralização óssea durante a evolução desses RNs no período neonatal. Em outros estudos, foi denominada de raquitismo da prematuridade em função dos achados radiológicos semelhantes aos da deficiência de vitamina D. Em 1985, foi proposta a utilização do termo doença metabólica óssea, que abrange situações que comportam desde a leve hipomineralização óssea até a presença de alterações radiológicas de raquitismo com fraturas espontâneas, incluindo, assim, as duas alterações descritas anteriormente (BROOKE *et al.*, 1985).

2.2.2 Prevalência

Koo e colaboradores observaram que osteopenia ocorreu em mais de 55% das crianças nascidas com peso inferior a 1000 g e em 23% das que têm peso de nascimento inferior a

1.500 g, sendo mais frequente nas nascidas com menos de 28 semanas de idade gestacional (IG) (KOO *et al.*, 1989). A prevalência registrada em pesquisa que comparou diferentes formas de alimentação foi de 40% em RNs prematuros que receberam leite materno sem suplementação de minerais, em contraste com 16% dos alimentados com fórmula ou leite materno associado à suplementação de cálcio e fósforo (RIGO, 2000).

Estudo realizado por Greer e colaboradores mostrou que a densidade óssea de uma criança a termo de 40 semanas permanece maior que a de um prematuro com 12 semanas de vida e IG de 28 semanas (GREER *et al.*, 1986). De forma similar pesquisadores avaliaram 64 prematuros que receberam durante a internação leite materno ou fórmula com suplementação de minerais. Por ocasião da alta, apesar da suplementação, 70% deles haviam desenvolvido *deficit* do crescimento. Com o leite materno exclusivo, foi mantido o ganho de peso linear, porém, com risco aumentado de apresentar valores baixos de CMO (OR 7,0) (KURL *et al.*, 2003).

Torna-se importante lembrar os possíveis efeitos da desmineralização a longo prazo. Pesquisadores evidenciaram que adultos jovens que foram RNs prematuros, quando comparados com um grupo controle nascido a termo, mostraram significativo comprometimento do esqueleto na adolescência, com o dobro de risco de apresentar DMO abaixo da normalidade. Estes achados podem predizer maior tendência de osteoporose e frequência de fraturas, demonstrando a importância de promover um tratamento nutricional e mecânico adequado para crianças nascidas prematuramente (PETTERI *et al.*, 2009). Resultados semelhantes foram apresentados por Chan e colaboradores, segundo os quais crianças de 5 a 9 anos nascidas prematuramente quando comparadas com população de referência, apresentaram peso corporal, altura e valor de massa óssea reduzidos, sendo que três do grupo de prematuros tiveram história de fraturas (CHAN *et al.*, 2008).

Apesar dos diferentes métodos utilizados nas pesquisas encontradas, fato que dificulta o conhecimento da real prevalência, observa-se que, independentemente da oferta nutricional adequada, indivíduos que nasceram prematuros, especialmente aqueles com peso de nascimento inferior a 1500 g, apresentam menor mineralização óssea, menor crescimento e mais tendência a fraturas ósseas quando comparados a RNs nascidos a termo (HORI *et al.*, 1995; WEILER, 2002; FEWTREL *et al.*, 2009; PETTERI *et al.*, 2009).

2.2.3 Etiologia

Quando a absorção de substrato é inadequada para a manutenção do desenvolvimento ósseo normal, a osteopenia poderá se desenvolver em RNs prematuros. Entretanto, este constitui apenas um dos fatores responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento de ossos saudáveis. Função endócrina, atividade física, infecções graves e condições maternas são outros fatores que podem influenciar no metabolismo ósseo (BROWN *et al.*, 1990; PEREIRA *et al.*, 1998; RIGO *et al.*, 2001).

O acréscimo de osso no desenvolvimento intrauterino é maior do que o ocorrido no prematuro no ambiente extrauterino. Tem sido aceito que esta diferença no acréscimo de osso no ambiente intrauterino é decorrente da diferença da viabilidade de Ca e P, minerais essenciais para a formação óssea (BISHOP, 1999). Portanto, a causa da doença óssea do prematuro tem sido descrita como proveniente da inviabilidade de oferta destes nutrientes associada a fatores que incluem aumento de reabsorção óssea, como doença crônica, displasia broncopulmonar e uso de drogas hipercalcêmicas, como furosemida para displasia broncopulmonar e metilxantinas para tratamento de apneia e bradicardia (BEYERS *et al.*, 1994; MORA *et al.*, 1994; DEMARINI *et al.*, 1997).

Algumas situações no período neonatal favorecem o desenvolvimento da doença óssea metabólica (BACKSTRON, 1996; GREER, 1994):

- RNs com peso de nascimento abaixo de 1500 g, principalmente os com menos de 1000 g, são suscetíveis ao seu desenvolvimento. Tal predisposição é mais importante nos RNs com peso de nascimento menores, uma vez que possuem maior necessidade de minerais para recuperar a trajetória normal de crescimento, sofrendo, assim, maior influência da deficiência mineral e da oferta nutricional pós-natal.

- RNs com menos de 32 semanas de idade gestacional, principalmente por apresentarem depósito mineral reduzido ao nascimento, já que são privados da fase de maior incorporação mineral, que ocorre no terceiro trimestre de gestação.

- Utilização de nutrição parenteral por tempo prolongado, levando a uma oferta diminuída de Ca e P quando comparada à intrauterina. Outro fator limitante da oferta mineral por meio da nutrição parenteral total (NPT) é o volume a ser administrado para cada RN, visto que volumes pequenos limitam as quantidades de minerais, pelo risco de precipitação da solução. A solubilidade na solução é dependente dos sais utilizados, do seu tempo de estoque, da temperatura ambiente, do pH, da concentração de aminoácidos e da dextrose. Entre as vantagens da alimentação enteral mínima estão a promoção da motilidade intestinal, a melhor tolerância alimentar, a redução da incidência de sepse e a indução da atividade da lactase.

- Terapêutica com diuréticos, provocando perda renal de Ca, por inibição da reabsorção de eletrólitos na porção ascendente da alça de Henle, com consequente calciúria.

- Situações que acarretem retardo no início da nutrição enteral, seja por impedimento a sua introdução, seja por limitação do volume a ser utilizado, como ocorre em quadros de insuficiência respiratória, displasia broncopulmonar, persistência do canal arterial e enterocolite necrosante.

– Baixa oferta mineral da dieta, em função do seu conteúdo no leite utilizado ou pelo baixo volume administrado.

– Displasia broncopulmonar, que apresenta vários fatores de risco associados com aumento de reabsorção óssea, como deficiência de oferta mineral enteral, pela limitação do volume administrado; utilização de diuréticos, levando à perda renal de Ca; utilização de corticoesteroides, com diminuição do conteúdo mineral ósseo, seja pela redução da absorção, seja pela perda renal; sedação e imobilização, que parecem reduzir a massa óssea.

– Imobilização, que pode ocasionar perda de massa óssea. A diminuição do movimento fetal e confinamento intrauterino têm sido considerados na doença óssea do prematuro. Esta observação sugere que a carga óssea pré-natal na forma de movimento fetal pode influenciar na resistência pós-natal durante o primeiro ano de vida e indicar que crianças com diminuição significativa da movimentação fetal tem risco de fraturas com forças físicas que não as causariam, especialmente nos primeiros 4 meses de vida.

– A utilização de corticoesteroides associa-se com diminuição da absorção intestinal de Ca, perda renal de Ca e redução do CMO.

Além das situações acima relacionadas, outros fatores podem prejudicar a mineralização óssea, como, por exemplo, fatores pré-natais, relacionados à oferta intrauterina de nutrientes essenciais para o desenvolvimento do feto. Portanto doenças maternas ou condições que afetam a transferência placentária de minerais para o feto podem comprometer a mineralização óssea fetal (HARRAST, 1998).

Um dos principais fatores pré-natais que afetam a mineralização é a restrição de crescimento intrauterino, resultando em RNs nascidos com peso inferior ao esperado para sua idade gestacional (PIG). Nangung encontrou baixos níveis de 1,25-(OH)₂D, redução da osteocalcina e baixo CMO em RNs PIG, correlacionando estes achados com redução do fluxo sanguíneo para o feto (NAMGUNG, 1993).

Fetos de mães diabéticas também podem apresentar deficiência na mineralização óssea intrauterina. Em estudo realizado por Husain e colaboradores, o transporte materno-fetal de cálcio mostrou-se 61% menor em mães diabéticas não tratadas comparadas com os controles (HUSAIN *et al.*, 1994). Demarini e colaboradores encontraram evidência de aumento de reabsorção óssea em fetos de mães diabéticas dependentes de insulina. A concentração do marcador de reabsorção óssea ICTP (telopectideo carboxiterminal do colágeno tipo I) foi mais alta em mães diabéticas que nos controles, sugerindo aumento de atividade osteoclástica nesta população (DEMARINI *et al.*, 1995).

Outro fator importante é o consumo de álcool materno, que foi associado com menor concentração de cálcio e PTH no sangue materno, além de menor peso e ossificação fetal (KEIVER *et al.*, 1996; SAMPSON *et al.*, 1996).

Em relação ao tabagismo materno, há evidências de associação negativa entre tabagismo durante a gestação e mineralização óssea de crianças nascidas a termo (JONES *et al.*, 1999). O tabaco leva à vasoconstrição dos vasos útero-placentários e ocasiona atraso de crescimento intrauterino fetal (MELHUS *et al.*, 1999).

2.2.4 Diagnóstico e gravidade

Os distúrbios de mineralização óssea variam desde um estado de hipomineralização, caracterizando a osteopenia da prematuridade até alterações mais intensas, como o raquitismo da prematuridade, que pode determinar deformidades articulares, escoliose e a fraturas não traumáticas ao longo dos primeiros anos de vida (GREER, 1986; BISHOP, 1989; TUBBS, 2004).

Nos casos mais graves, o diagnóstico clínico pode ser estabelecido entre 2 e 4 meses e caracteriza-se por sinais de raquitismo, com achatamento posterior do crânio, espessamento das junções condrocostais, alargamento das porções distais do rádio e do cúbito, aumento da fontanela anterior, das bossas frontais e redução do crescimento. Este quadro caracteriza-se como raquitismo da prematuridade, porém o mais frequente é a hipomineralização. O diagnóstico da hipomineralização, entretanto, é geralmente mais tardio, pois quando aparecem sinais radiológicos, já houve perda de 40% de minerais, com consequente redução da DMO (DABEZIES *et al.*, 1997).

As fraturas de costelas e ossos longos incidem em 10% dos prematuros de muito baixo peso. Em uma série de prematuros estudados, a média de idade do diagnóstico das fraturas foi de 76 dias, incluindo fraturas metafisárias, de ossos longos e de costelas (DABEZIES *et al.*, 1997).

A avaliação mais precisa é efetuada ao se determinar o CMO de corpo total por análise de composição corporal com o aparelho de absorção de fótons. Porém, trata-se de uma avaliação estática da qualidade óssea e depende da gravidade e da duração da deficiência de minerais. Além disto, medidas de CMO permanecem em grande parte no domínio da pesquisa por serem tecnicamente exigentes ou estarem indisponíveis para aplicabilidade na assistência na maioria dos centros (KOO *et al.*, 2004).

A avaliação da mineralização óssea por medidas antropométricas apresenta dificuldades para o uso em pesquisas. O peso corporal pode ser afetado por fatores como balanço hídrico e pode ser difícil realizar medidas antropométricas em pacientes que requerem perturbação mínima (BROOKE, 1985; CROFTON *et al.*, 1999).

Conclui-se que o diagnóstico e a avaliação da mineralização óssea e do crescimento pós-natal em RNs prematuros são um desafio contínuo para as unidades de terapia intensiva neonatais. O período de rápido crescimento pós-natal dificulta o estabelecimento de valores

de referência para diagnóstico em populações pediátricas. Porém, a utilização de alguns marcadores bioquímicos associados aos exames de composição corporal, pode fornecer medidas de acompanhamento dos efeitos das intervenções terapêuticas ósseas e do crescimento (CROFTON, 1999).

2.2.5 Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo

Marcadores bioquímicos têm sido considerados para identificar prematuros com doença óssea metabólica e seu uso tem trazido grandes contribuições científicas sobre a fisiologia e fisiopatologia do tecido ósseo, uma vez que são usados para avaliar com maior sensibilidade as alterações ósseas, além da capacidade de avaliação dinâmica que se deseja em um marcador de remodelação óssea. Auxiliam, portanto, no diagnóstico mais precoce, na decisão terapêutica e no acompanhamento do tratamento (SARAIVA & LAZARETTI-CASTRO, 2002).

O osso está constantemente sujeito a um processo metabólico designado renovação, que inclui um processo de degradação óssea mediada pela ação dos osteoclastos, e um processo de formação óssea mediada pela ação dos osteoblastos. Estes dois processos constituem um equilíbrio necessário à renovação, que é fundamental para a saúde do osso (RIGGS, 1991). Nos estados anormais do metabolismo ósseo, este processo torna-se desproporcional e, quando a reabsorção é superior à formação, o resultado é uma perda líquida de osso que pode resultar em osteopenia ou perturbações do tecido ósseo (PRICE, 1993). A medição de marcadores bioquímicos específicos destes eventos de renovação fornece dados analíticos sobre a velocidade do metabolismo ósseo ou renovação” (RIGGS, 1991).

Os marcadores ósseos bioquímicos são divididos em três categorias: enzimas ou proteínas (que são secretadas pelas células envolvidas na remodelação), produtos da quebra do colágeno e produtos oriundos da síntese do novo osso. Por se tratar de um processo conjugado, esses marcadores refletem o estado geral da remodelação, mas são, em geral, classificados de acordo com as situações nas quais estão agudamente elevados. Uma vez que o processo de reabsorção é mais curto do que o de formação, marcadores de reabsorção respondem mais rapidamente às mudanças do que os de formação (WATTS, 1999).

Os marcadores de reabsorção óssea incluem uma enzima, a fosfatase ácida tartarorresistente, e produtos de degradação da matriz óssea, como hidroxiprolina, piridinolina, deoxipiridinolina e telopeptídios. Os marcadores de formação óssea incluem uma enzima, a fosfatase alcalina, e produtos derivados da síntese da matriz óssea, como osteocalcina, fragmentos amino e carboxiterminais do pró-colágeno (WATTS, 1999).

2.2.5.1 Fosfatase alcalina total

Durante a formação do osso, a produção da matriz colágena precede a mineralização. A fase de produção da matriz colágena coincide com uma maior produção de fosfatase alcalina total (FA) presente no soro. Em função disto, doenças que alteram a diferenciação osteoblástica tendem a alterar a relação dos marcadores de formação (VIEIRA, 1999).

A FA contida no soro humano consiste, fisiologicamente, no somatório de várias isoenzimas que provêm do osso, do fígado, do intestino e da placenta durante a gravidez. A medida da atividade total da FA durante décadas foi a base de estudo de patologias tanto ósseas como hepáticas; porém, nas condições em que se espera uma alteração muitas vezes

sutil dos níveis séricos, a medida passa a apresentar perda de sensibilidade e especificidade (VIEIRA *et al.*, 1999).

A FA exibe correlação negativa com o processo de formação óssea, apresentando elevação dos seus valores acima de 800 U/L em processos de desmineralização. O aumento na FA, com ponto de corte correspondente a cinco vezes o valor de referência para adultos normais, tem sido empregado em crianças na prática clínica. Os valores de referência podem estar elevados durante fases de crescimento ou em casos de doenças hepáticas ou ósseas, sendo aceita como valores normais em RNs prematuros a média de 800 U/L, que indica atividade osteoblástica relacionada ao crescimento (KOVAR *et al.*, 1982; RYAN, 1993). Entretanto, pesquisadores não observaram associação entre CMO e FA ou P sérico em prematuros, por ocasião da idade correspondente ao termo e concluíram que medidas de rotina de FA e P sérico não são úteis para predizer a evolução da mineralização óssea em RNs prematuros (FAREK *et al.*, 2002).

2.2.5.2 Fosfatase alcalina óssea específica

A fosfatase alcalina óssea específica (FAO) é uma glicoproteína tetramérica específica do osso, que se encontra na superfície das células dos osteoblastos. Está presente nos condrócitos hipertróficos na placa de crescimento epifisária (PRICE, 1993; CROFTON *et al.*, 1999). Apesar da grande semelhança estrutural entre as isoformas, imunoenaios específicos foram desenvolvidos para a isoforma óssea, o que diminui a reação cruzada com a isoforma hepática em 15% a 20% (WATTS, 1999). Sua determinação apresenta vantagens sobre a osteocalcina por ter meia-vida maior (1 a 2 dias), não ser afetada por variações diurnas e ter menos interferentes pré-analíticos. Diferentemente da FA, exibe correlação positiva com o

processo de formação óssea. É considerado o melhor marcador de formação em pacientes com insuficiência renal, pois não é influenciada pela filtração glomerular (RAUCH, 1997).

Crofton e colaboradores investigaram a hipótese de que a FAO poderia fornecer medidas úteis de crescimento e mineralização óssea em RNs prematuros. Foram realizadas medições semanais dos marcadores durante as 10 primeiras semanas de vida e relacionadas com as taxas de ganho de peso, crescimento, comprimento dos membros inferiores e medidas de conteúdo mineral ósseo em 25 RNs prematuros com idade gestacional entre 24 e 31 semanas e média de peso de nascimento entre 784 e 1.266 g. A FAO apresentou correlação positiva com a taxa de crescimento mineral ósseo ($r = +0,55$; $p = 0,01$). Concluiu-se que ele parece ser um bom marcador para a mineralização óssea em bebês prematuros e foi sugerido que este marcador é capaz de fornecer informações sobre a renovação total do corpo ósseo e do colágeno, oferecendo informações complementares às medidas físicas tradicionais de crescimento e mineralização óssea (CROFTON *et al.*, 1999).

2.2.5.3 Piridinolina e deoxipiridinolina urinária

Piridinolina (PID) e deoxipiridinolina (DPID) são marcadores urinários de redução de colágeno e constituem as ligações cruzadas da estrutura helicoidal do colágeno tipo I. O colágeno tipo I do osso, que representa 90% da matriz orgânica, tem ligações cruzadas com moléculas que proporcionam rigidez e resistência. São liberadas para a circulação sanguínea durante o processo de reabsorção óssea e excretadas sem serem metabolizadas na urina. A quantidade de PID e DPID urinárias refletem a reabsorção óssea (atividade osteoclástica), sendo excretadas na razão 3:1 (DPID/PID) (RIGGS, 1991).

A DPID é considerada mais sensível que a PID, por não ser influenciada pela dieta. Por não ser absorvida pelo intestino, sua excreção urinária pode ser mensurada sem necessidade de restrição alimentar, tornando-se vantajosa para exames em pacientes pediátricos (COLWELL & RUSSELL, 1993). A DPID é mais específica para o tecido ósseo, uma vez que a PID, que difere apenas por um grupo hidroxila, também pode ser derivada da cartilagem articular e dos tecidos moles. Níveis elevados são encontrados quando há alguma forma de doença óssea que predisponha à desmineralização (WATTS, 1999).

Para validar estes marcadores como medidas substitutivas dos processos dinâmicos de crescimento, pesquisadores verificaram que a PID e a DPID foram inversamente relacionados com o ganho de peso, mas não com a velocidade de crescimento dos membros inferiores, provavelmente porque eles refletem o processo do corpo inteiro em vez de apenas os membros inferiores (GFATTER, 1997; CROFTON *et al.*, 1999).

Gfatter e colaboradores estudaram a excreção de PID e DPID em 43 RNs a termo e pré-termo nos primeiros dois meses de vida pelo método ELISA. Os indivíduos selecionados não tinham história de cardiopatias ou de doenças endócrinas, metabólicas, ósseas ou pulmonares. Os valores médios de DPID encontrados nos RNs prematuros foram de 177 ± 60 nmol/mmol. Os RNs pré-termo obtiveram valores estatisticamente mais altos destes marcadores na urina ($p < 0,05$). Após análise de covariância os resultados demonstraram não haver interferência do gênero nos valores de referência. Os autores concluíram que a PID e a DPID em RNs fornecem informações sobre o crescimento do esqueleto e que o método ELISA é adequado para avaliar estes marcadores (GFATTER *et al.*, 1997).

Os pesquisadores concordam que PID e DPID apresentam boa sensibilidade para detectar desmineralização óssea (coeficiente de correlação de 0,83 a 0,97). Porém, como o crescimento do esqueleto de crianças é dependente do peso de nascimento e idade gestacional e como cada criança tem uma frequência individual no seu remodelamento ósseo, torna-se

difícil estabelecer um valor normal como referência para crianças, especialmente prematuras. (SEYEDIN *et al.*, 1993; KAMEL *et al.*, 1994; RAUCH *et al.*, 1994)

De acordo com pesquisas realizadas por Hubert e colaboradores, a variabilidade das medidas de PID e DPID na urina pode ser evitada analisando-se fatores que contribuem para a interpretação dos dados. Os pesquisadores sugerem que a padronização da coleta e análise pode evitar esta variabilidade. As amostras devem ser coletadas em um horário ou turno específicos, evitando a variabilidade relacionada ao ciclo circadiano, e não devem permanecer expostas diretamente à luz. Se analisadas após 24 horas, devem ser congeladas de -20 a -80°C. Torna-se importante analisar em conjunto o uso de suplementos na dieta, como vitamina D, cálcio e demais minerais (HUBERT *et al.*, 2002).

2.3 TRATAMENTO DA OSTEOPENIA DA PREMATURIDADE

Tem sido referido que, para uma formação óssea extrauterina adequada em RNs prematuros, são necessárias ofertas similares de Ca e P correspondentes ao terceiro trimestre gestacional. Entretanto, é difícil ofertar no ambiente extrauterino, por meio de alimentação estes níveis possíveis pela via placentária (DEMARINI *et al.*, 1997).

2.3.1 Suplementação de minerais e vitaminas

Pesquisadores têm documentado mudanças na mineralização óssea de acordo com os níveis de nutrientes e minerais ofertados, que podem ser administrados sob a forma de leite materno suplementado ou através de fórmulas especiais para prematuros (KOO & TSANG, 1993; TRINDADE, 2005; ROCHOW *et al.*, 2010). Estudos longitudinais randomizados sugerem a necessidade de altos níveis de oferta de Ca e P e vitamina D para promover adequada mineralização óssea em prematuros (GREER *et al.*, 1986; HORSMAN *et al.*, 1989; BACKSTRON *et al.*, 1999). No entanto, os minerais retidos pelo organismo são resultantes do total ministrado, do total absorvido pelo intestino e da quantidade eliminada pelos rins e pelas fezes (TRINDADE, 2005).

A Academia Americana de Pediatria estabeleceu que as necessidades nutricionais de prematuros devem ser equivalentes às necessidades intrauterinas no terceiro trimestre. Porém as intervenções nutricionais, apesar de promoverem um ganho de peso adequado, têm mostrado um efeito mínimo na mineralização óssea de prematuros (HORI *et al.*, 1995; KURL *et al.*, 2002; PETTERI *et al.*, 2009).

2.3.2 Leite materno *versus* fórmulas na prevenção e tratamento da doença óssea metabólica

Estudos reunindo dados de pesquisas sobre leite humano relatam que o conteúdo de Ca no colostro inicial é, em média, de 160 mg/L, passando no terceiro dia para 256 mg/L e persistindo nestes valores até 3 meses, quando declina lentamente até 176 mg/L ao redor de um ano. O conteúdo do leite das mães de RNs prematuros não difere em relação ao Ca e ao P

no primeiro mês de vida. Estes dados indicam que o conteúdo mineral do leite humano, no volume possível de ser ministrado, é insuficiente para manter a mineralização pós-natal de prematuros em níveis observados na fase intrauterina. Com intuito de resolver este problema, foram desenvolvidos suplementos nutricionais para o leite humano, com formulações variadas quanto ao conteúdo de Ca e P, proteínas e outros minerais, bem como fórmulas especiais para prematuros que se propõem a ministrar quantidades elevadas de minerais, no sentido de melhorar a mineralização óssea desses prematuros (RIGO *et al.*, 2000). Pesquisadores verificaram que a média de absorção de Ca em prematuros alimentados com fórmulas para pré-termo varia de 36% a 75% do ingerido, semelhante ao observado para o leite humano fortificado com cálcio (KOO & TSANG, 1993). Uma revisão sistemática sobre o efeito do leite materno fortificado com multicomponentes constatou que esta intervenção foi associada com aumento no crescimento linear, perímetro cefálico e ganho de peso (KUSCHEL & HARDING, 2004).

Rigo e colaboradores verificaram que as fórmulas para prematuros apresentam taxas de incorporação mineral semelhantes ao leite humano, apesar de menor do que a observada intrauterino, entretanto, produzem maior crescimento longitudinal (RIGO *et al.*, 2000). Da mesma forma, Kurl e colaboradores estudaram 64 prematuros que receberam durante a internação leite materno suplementado. Após a alta, foram amamentados com leite materno ou com fórmula padrão. Por ocasião da alta, 70% deles haviam desenvolvido déficit do crescimento. Com o leite materno, foi mantido o ganho de peso linear, porém com risco aumentado (OR 7,0; IC 95% 1,2-41,7) de valores baixos de CMO. Os autores concluem que a suplementação do leite humano, bem como a utilização de fórmulas especiais, proporciona melhor crescimento, porém não normalizam a mineralização óssea (KURL *et al.*, 2002).

2.3.3 Efeitos da carga mecânica na mineralização

Enquanto as forças mecânicas nos ossos estimulam sua formação e crescimento, a inatividade predispõe à reabsorção (LARSON, 2000). A força mecânica exercida pela atividade física tem mostrado um efeito positivo na massa óssea de crianças, jovens e adultos (McINTYRE *et al.*, 1992; VICKERS *et al.*, 2004; MCKELVIE *et al.*, 2004).

É consensual na literatura especializada que atividades físicas de maior sobrecarga decorrentes do peso corporal bem como o treinamento de força causam estímulos osteogênicos devido ao aumento do estresse mecânico exercido sobre os ossos (CREIGHTON *et al.*, 2001). Entretanto, o processo fisiológico responsável pela resposta a esse esforço não é claramente explicado. Segundo Menkes e colaboradores, uma possível justificativa para o aumento da DMO com o treinamento de força é o efeito piezoelétrico ósseo. Este efeito é sugerido pela presença de sinais bioquímicos que parecem refletir um campo elétrico, possivelmente decorrente da sobrecarga aplicada. Essa teoria se aplica a qualquer deformação ou sobrecarga óssea causada por compressão, tensão, torção ou cisalhamento do tecido ósseo, que ao gerar diferenças no potencial elétrico dos ossos, agem como um campo elétrico estimulador da atividade celular, levando à deposição de minerais nos pontos de estresse (MENKES *et al.*, 1993). Turner e colaboradores constataram que cargas mecânicas em ossos criam um movimento na rede lacunar-canalicular preenchida pelos fluidos ósseos que promove uma cascata de eventos celulares, incluindo a elevação dos níveis intracelulares de Ca, dos fatores de crescimento e da produção de matriz óssea (TURNER *et al.*, 1998). Estudo realizado com ratos submetidos a exercícios por 13 semanas resultou em um balanço positivo de Ca e P e em aumento de massa óssea, com excreção urinária de Ca e P semelhantes entre os grupos. Esta diferença foi atribuída a uma melhor absorção intestinal de cálcio (YEH *et al.*, 1989).

Embora a sustentação de peso seja um dos fatores mais importantes para influenciar a formação e reabsorção dos ossos, existem evidências de que exercícios que não utilizam sustentação de peso também podem beneficiar a osteogênese (BOURRIN *et al.*, 1995; TURNER *et al.*, 2005). De acordo com Andreoli e colaboradores, a respeito da remodelação óssea na indução de esforço, uma pequena deformação ocorrida nas estruturas ósseas pode aumentar a formação e inibir a reabsorção que ocorre dentro do ciclo de remodelação óssea normal. Isso indica que, em nível celular, o processo de remodelação induzido por uma determinada carga é realizado pela ação dos osteócitos que atuam como receptores mecânicos do estresse e liberam um fator químico estimulador da proliferação de osteoblastos no local estressado (ANDREOLI *et al.*, 2001). Outros pesquisadores acrescentam que o aumento da carga mecânica gera uma força de tensão, que impede o remodelamento dos ossos e conserva ou aumenta a massa óssea (BARENGOLTS *et al.*, 1994; PENG *et al.*, 1994; BAYRAMOGLU *et al.*, 2005).

Apesar dos benefícios dos exercícios reportados em diferentes idades, seus efeitos no metabolismo ósseo de indivíduos em fase crescimento parecem ter associação com adequada oferta nutricional. Specker & Mulligan reportaram o efeito de um ano de exercícios no CMO de crianças e verificaram que aquelas randomizadas para o grupo exercício com baixa oferta de Ca obtiveram CMO mais baixo. Os autores concluíram que um programa de exercícios em crianças em fase de crescimento rápido pode reduzir o acréscimo de osso se houver baixa oferta de nutrientes. Por esse motivo, deve haver cautela ao iniciar um programa de exercícios em crianças com nutrição inadequada, com doenças crônicas ou em uso de medicações que interfiram na absorção de nutrientes (SPECKER & MULLIGAN, 1999).

2.3.4 Fisioterapia motora e metabolismo ósseo de RNs

A rotina em prematuros hospitalizados inclui o manuseio mínimo, com objetivo de facilitar a estabilidade e minimizar o estresse. O resultado desta inatividade pode levar a uma estimulação inadequada do metabolismo ósseo (VICKERS *et al.*, 2004; MILLER, 2003).

O estudo do efeito da estimulação passiva em prematuros é recente. Em 1995, Moyer-Mileur e colaboradores realizaram um estudo piloto com 26 prematuros. Foi testado um protocolo de 5 minutos de exercícios passivos ao dia, por 4 semanas, em prematuros de até 34 semanas de idade gestacional e internados em unidade de terapia intensiva. Para avaliar a mineralização foram levantados dados antropométricos e avaliados níveis séricos de Ca, P, FA, PTH, vitamina D, além de densitometria óssea por *single beam photon absorptiometry* realizada no antebraço. Não houve diferenças nos grupos quanto ao ganho em comprimento, havendo uma média maior em ganho de peso por dia no grupo exercício. O percentual de ganho em CMO foi de 34 % no grupo exercício, enquanto o grupo controle obteve redução de 11%. A FA teve valores mais altos no grupo controle ao final do estudo. Apesar do tamanho de amostra pequeno, com estes resultados os autores puderam sugerir que este protocolo de exercícios passivos é capaz de aumentar os efeitos de uma adequada nutrição em prematuros saudáveis, promovendo ganho em massa óssea similar aos ganhos intrauterinos e diminuindo risco de osteopenia (MOYER-MILEUR *et al.*, 1995).

O mesmo grupo de pesquisadores, em 2000, publicou resultados semelhantes de um novo ensaio clínico realizado com 32 pacientes, utilizando o mesmo protocolo de exercícios. A mineralização óssea foi avaliada através da análise de composição corporal por DEXA realizado no antebraço e marcadores bioquímicos. O grupo intervenção apresentou valores significativamente maiores de ganho de peso, além de maior CMO e massa muscular. Os

valores da análise bioquímica foram similares entre os grupos. Apesar dos resultados positivos, os autores ressaltam que a avaliação por DEXA de segmentos ósseos necessita de novos estudos para verificar o quanto esta técnica pode prever a massa óssea corporal total em prematuros. Outra limitação importante foi relacionada com as perdas referentes aos marcadores bioquímicos (MOYER-MILEUR *et al.*, 2000).

Nemet e colaboradores publicaram os resultados de uma pesquisa semelhante com 24 prematuros. Utilizaram o mesmo protocolo de exercícios proposto anteriormente por Moyer-Mileur e colaboradores. Para avaliar a mineralização óssea foram utilizados os marcadores bioquímicos de formação óssea FAO e fragmento carboxiterminal do pró-colágeno tipo 1 (PICP). A reabsorção foi avaliada pelo marcador ICTP. O grupo exercício apresentou significativo aumento em FAO e redução de ICTP, porém o aumento no PICP não alcançou significância estatística. Os autores concluíram que, apesar da amostra pequena, um breve período de exercícios foi associado com evidência bioquímica de formação óssea em RNs prematuros (NEMET *et al.*, 2002).

Litmanovitz e colaboradores realizaram estudo semelhante ao de Moyer-Mileur, porém com início do protocolo na primeira semana de vida. Utilizaram como instrumentos de avaliação ultrassonografia quantitativa da tíbia que mensura resistência óssea e análise bioquímica. Na análise bioquímica, observaram aumento da formação óssea e redução da reabsorção no grupo intervenção, porém não houve diferenças significativas entre os grupos no final do estudo. A resistência avaliada por ultrassonografia quantitativa apresentou valores menores no grupo controle, ao passo que permaneceu estável no grupo exercício. Concluíram que há redução importante da resistência óssea em prematuros no primeiro mês de vida pós-natal, e que um breve período diário de exercícios atenua esta perda, o que diminui o risco de osteopenia nesta população. Os autores acreditam que o ganho não foi similar ao verificado por Moyer-Mileur pela utilização de outra técnica de mensuração, pois a ultrassonografia

quantitativa avalia a arquitetura óssea e a elasticidade, que pode ser inferior ao CMO no mesmo período (LITMANOVITZ *et al.*, 2003).

Nosso grupo de pesquisa publicou em 2008 os resultados de um ensaio clínico randomizado realizado com 29 RNs prematuros estáveis e idade gestacional inferior a 35 semanas, internados na UTI neonatal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O protocolo de fisioterapia motora foi aplicado por um período superior ao dos estudos anteriores (15 minutos), 5 vezes na semana por um período médio de 25 dias. As variáveis avaliadas foram medidas antropométricas e análise de composição corporal total por DEXA, verificando CMO, DMO, massa muscular e gordura corporal no início e no final do estudo. A média de ganho de peso e comprimento linear foi superior no grupo intervenção. O ganho de CMO após ajustes para o tipo de leite e ganho de peso foi de $434 \pm 274,55$ mg e GC de $-8,18 \pm 11,37$ mg. O ganho de DMO após os mesmos ajustes foi de $8,37 \pm 5,63$ no grupo intervenção contra $-3,15 \pm 5,53$ nos controles. A média de ganho de massa muscular no GF foi $272,13$ g contra $109,10$ no GC. Estas diferenças entre os grupos foram significativas. Concluímos que 15 minutos de estimulação passiva são superiores a 5 minutos para promover mineralização óssea em prematuros e sugerimos que o exercício no prematuro é um importante instrumento na prevenção da osteopenia da prematuridade (VIGNOCHI *et al.*, 2008).

Outras formas não invasivas de estimulação, como estimulação tátil (massagens), em geral relataram melhoras no crescimento, no comportamento e no desenvolvimento de RNs prematuros. A estimulação tátil associada ou não a movimentos passivos tem levado a maior crescimento e mineralização óssea no período de internação neonatal, menos estresse e melhor desempenho nas avaliações do desenvolvimento (HERNANDEZ *et al.*, 1991; SCAFIDI *et al.*, 1993; FIELD *et al.*, 2006).

Kuhn e colaboradores observaram que a massagem que incorpora tanto a estimulação tátil como movimentos ocasiona aumento de peso e facilita o desenvolvimento neuronal em

prematuramente. Indivíduos em condições não estressantes demonstraram valores mais altos de catecolaminas e cortisol (KUNH *et al.*, 1991).

De forma similar, estudos experimentais fornecem fortes evidências do potencial da massagem terapêutica para modular a resposta neuroendócrina ao estresse. Em modelos animais, situações de estresse pós-natal, tais como separação materna, dor repetitiva ou desnutrição na infância, interrompem a maturação na resposta da adrenal ao estresse e afetam permanentemente a estrutura corporal, a fisiologia e o metabolismo, aumentando a incidência de doenças crônicas do adulto (MEANEY *et al.*, 1996).

A estimulação tátil durante a vida pós-natal precoce parece melhorar o controle da dor e o ganho de peso e diminuir a resposta comportamental e endócrina ao estresse em animais adultos (ALASMI *et al.*, 1997; VAN *et al.*, 1998). De forma similar Chatterjee e colaboradores demonstraram que a estimulação tátil durante a vida pós-natal precoce reverte alterações neuronais induzidas pelo isolamento materno (CHATTERJEE *et al.*, 2007).

Estudo realizado recentemente em modelo animal com RNs utilizando histomorfometria demonstrou que estímulos táteis e cinestésicos foram associados com maior ganho de peso, massa muscular, crescimento e resistência óssea e que os efeitos benéficos permaneceram na idade adulta, sendo este o único estudo que avaliou respostas ósseas a longo prazo (CHEN *et al.*, 2009).

Outras pesquisas relacionadas ao estresse neonatal em animais e humanos têm relatado associação inversa entre ganho de peso e níveis de cortisol ou epinefrina, além de aumento da liberação de hormônio do crescimento (GH). Postula-se que a massagem modula a resposta do sistema nervoso autônomo e a recuperação a estressores ambientais, minimizando o impacto negativo de estresse pós-natal sobre o crescimento (JUTAPAKDEEGUL *et al.*, 2003; PANOGIOTARPOULOS *et al.*, 2004; FENOGLIO *et al.*, 2006; MOYER-MILEUR *et al.*, 2008).

O crescimento somático é regulado pela ação do GH, que estimula o IGF 1 no fígado, ossos, músculos e outros tecidos. A atividade do eixo GH/IGF1 é maior no período pós-natal e na adolescência. Moyer-Mileur reportou mais altos níveis de IGF 1 e depósito mineral ósseo em prematuros que receberam das mães ou de profissionais estímulos táteis e cinestésicos pós-natais diários. Entretanto, há necessidade de estudos para averiguar os mecanismos envolvidos na associação entre ganho de peso, massa óssea, estimulação tátil e GH/IGF1 (MOYER-MILEUR *et al.*, 2008).

De acordo com revisão sistemática publicada em 2010, existem algumas evidências de que exercícios passivos podem promover melhoras no ganho de peso e na mineralização óssea em prematuros nas primeiras semanas de vida. Porém é ressaltado que as pesquisas existentes possuem limitações metodológicas, utilizam diferentes métodos de avaliação e possuem amostras consideradas pequenas, havendo ainda necessidade de ensaios clínicos, principalmente com grupos de RNs com maior risco de adquirirem osteopenia (SCHULZKE *et al.*, 2010).

3 JUSTIFICATIVA

As evidências atuais indicam que a fragilidade óssea que acomete RNs prematuros, apesar da adequada oferta nutricional, permanece na infância e adolescência, ocasionando comprometimento da densidade mineral óssea, peso corporal, altura e maior de risco de fraturas no decorrer da vida quando comparadas à população de referência. Os efeitos da desmineralização levam à necessidade de implementar medidas que previnam estas alterações, através de abordagens que incluam adequada oferta nutricional e estimulação mecânica para crianças nascidas prematuramente. Uma vez que as evidências atuais ainda são escassas, há necessidade de estabelecer as consequências da limitação dos movimentos na mineralização óssea, além de conhecer os efeitos da estimulação passiva nos processos de formação e reabsorção óssea de RNs prematuros.

4 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da fisioterapia motora na mineralização óssea em recém-nascidos prematuros com idade gestacional igual ou inferior a 35 semanas.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

– Avaliar a formação e a reabsorção óssea de recém-nascidos prematuros, antes e após uma intervenção fisioterapêutica, por meio dos marcadores bioquímicos fosfatase alcalina óssea dosada no plasma e deoxipiridinolina dosada na urina.

– Comparar o ganho de peso diário de recém-nascidos prematuros durante o período de estudo.

– Estabelecer a existência de correlação entre ganho de peso e marcadores bioquímicos.

5 HIPÓTESE

A fisioterapia motora passiva realizada 15 minutos ao dia no período de internação neonatal promove maior ganho de peso, maior formação óssea e menor a reabsorção óssea em RNs prematuros com idade gestacional igual ou inferior a 35 semanas. O ganho de peso apresenta correlação com os marcadores bioquímicos utilizados.

6 PACIENTES E MÉTODOS

6.1 DELINEAMENTO

Trata-se de um ensaio clínico randomizado.

6.2 LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi desenvolvido na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS.

6.3 POPULAÇÃO EM ESTUDO

A população em estudo foi constituída de todos os RNs prematuros nascidos e internados na unidade de terapia intensiva neonatal do HCPA.

6.4 AMOSTRA DA PESQUISA

Os pacientes estudados foram os RNs prematuros com idade gestacional igual ou inferior a 35 semanas, com tamanho adequado para idade gestacional (AIG), nascidos e internados na unidade de terapia intensiva neonatal do HCPA.

6.5 AMOSTRA

6.5.1 Critérios de inclusão

Para serem incluídos no estudo, os RNs deveriam:

- ser prematuros com idade gestacional igual ou inferior a 35 semanas;
- ter peso de nascimento entre o décimo e nonagésimo percentil para idade gestacional

(AIG) (ALEXANDER *et al.*, 1996)

- estar estáveis;
- ter condições de receber dieta enteral com média calórica de 110 Kcal/kg ao dia.

6.5.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os RNs:

- com diagnóstico de hemorragia periventricular graus 3 e 4, definida por ecografia realizada na rotina assistencial;
- com diagnóstico de displasia broncopulmonar, definida como necessidade de oxigênio suplementar (FiO₂ superior a 21%) após 36 semanas de idade corrigida (JOBE & BANCALARI, 2001);
- com diagnóstico de síndromes genéticas ou malformações congênitas;
- com diagnóstico de doenças neurológicas e ortopédicas;
- em ventilação mecânica no momento da randomização;
- em uso de diuréticos ou corticoesteroides.

6.6 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no programa PEPI (*Programs for Epidemiologists*) versão 4.0 e baseado no estudo de Litmanovitz *et al*, (2003). Para um nível de significância de 5%, um poder de 90%, um desvio padrão para o marcador FAO de 14 U/L e uma diferença de 20 U/L entre os dois grupos, esperando um tamanho de efeito padronizado de 1,43, obteve-se um valor mínimo de 12 pacientes em cada grupo. Ao considerar um coeficiente de variação de 1% entre os ensaios, a amostra foi aumentada para 15 pacientes por grupo.

6.7 RANDOMIZAÇÃO

Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão, no momento em que estavam tolerando alimentação enteral mínima de 110 kcal/kg ao dia foram randomizados para grupo controle (GC) ou grupo fisioterapia (GF).

Para a randomização foi gerada uma sequência de números aleatórios. Um funcionário não envolvido na pesquisa realizou a alocação dos grupos.

6.8 INTERVENÇÃO FISIOTERAPÊUTICA

O GC recebeu cuidados de rotina da equipe de enfermagem, além de cuidados maternos diários, como colo ou carinho, porém sem movimentação e compressão articular padronizada. O GF, além dos cuidados maternos, recebeu diariamente a intervenção de um fisioterapeuta, 5 vezes por semana, 15 minutos ao dia, com no mínimo 30 minutos de

intervalo após a alimentação, sendo interrompida assim que o RN atingisse 2 kg (alta hospitalar).

Os exercícios realizados foram movimentos de flexão e extensão passivos com compressões articulares suaves. Foram realizadas 10 repetições de cada movimento nos punhos, cotovelos, ombros, tornozelos, joelhos e quadris, em decúbitos laterais direito e esquerdo. O tratamento foi realizado por um fisioterapeuta, que recebeu treinamento.

6.9 VARIÁVEIS PRINCIPAIS

Todas as amostras foram armazenadas em *freezer* localizado no centro de pesquisas do HCPA até a conclusão do período da coleta dos dados. As dosagens laboratoriais foram realizadas no laboratório de pesquisa em patologia clínica do HCPA.

6.9.1 Fosfatase alcalina óssea específica: marcador de formação óssea

As amostras de sangue periférico foram coletadas no turno da manhã, após a randomização e por ocasião da alta hospitalar. Após a coleta o sangue não heparinizado era centrifugado, o plasma separado e armazenado em freezer a uma temperatura de -80°C em tubos *ependorf* devidamente identificados com o número do paciente.

O ensaio utilizado foi o METRA BAP- QUDEL, através do método ELISA. Todas as amostras foram mensuradas em duplicata, sendo utilizado o valor da média dos ensaios. Os resultados foram expressos em U/L.

6.9.2 Deoxipiridinolina urinária: marcador de reabsorção óssea

As amostras de urina foram coletadas após a randomização e por ocasião da alta hospitalar. A coleta era realizada no turno da manhã em virtude da variabilidade no marcador relacionada ao ciclo circadiano, através de saco coletor e, em seguida, transferida para uma seringa de 1 ml. Após coletado, o material era centrifugado e armazenado em *eppendorfs* a uma temperatura de -80°C , de acordo com recomendações do fabricante. Para análise, foi realizado o ensaio METRA-DPD-QUIDEL, através do método ELISA. Todas as análises foram realizadas em duplicata, sendo utilizado o valor da média de ambos. Os resultados foram expressos em nanomols por litro de urina e corrigidos por creatinina (nmol/mmol).

6.9.3 Peso corporal

O peso corporal (g) era mensurado diariamente, no mesmo horário, por um auxiliar que desconhecia a alocação dos grupos. Os RNs foram pesados despídos, sempre nas mesmas balanças digitais. O valor do peso diário em g era registrado em ficha de coleta de dados (Anexo 1).

6.10 REGISTRO DA OFERTA DE NUTRIENTES

A alimentação enteral consistiu de leite materno com suplemento ou fórmula infantil na ausência deste. Todos os dados referentes à alimentação eram registrados diariamente e transformados em médias diárias de calorias, minerais, gorduras, proteínas e vitaminas (Anexo 1).

6.11 EXAMES COMPLEMENTARES

As dosagens dos níveis séricos e urinários de Ca e P eram obtidas semanalmente do prontuário, por serem exames realizados na rotina assistencial destes pacientes.

Os níveis de PTH foram dosados no início do estudo e por ocasião da alta hospitalar.

Todos os exames laboratoriais foram realizados de forma cega por funcionários que não estavam envolvidos com a pesquisa.

6.12 INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

Os seguintes dados foram coletados do prontuário do nascimento até a alta hospitalar:

- peso de nascimento;
- data de nascimento;
- comprimento ao nascimento;
- idade gestacional;
- gênero;
- etnia;
- Apgar;
- data da alta hospitalar;
- história clínica;
- dias em ventilação mecânica;
- dias em oxigenioterapia;
- dias em NPT;
- medicamentos.

6.13 CARACTERÍSTICAS MATERNAS

Os seguintes dados foram coletados através de registros do prontuário e entrevistas:

- idade;
- doenças crônicas;
- tabagismo na gestação;
- uso de álcool e drogas;
- uso de medicamentos;
- data do parto.

6.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados sobre FAO e DPID foram comparados por análise de covariância (ANCOVA) e expressos através de média e desvio padrão. As médias de ganho em DPID e FAO foram ajustadas utilizando como covariante a diferença observada nas médias iniciais de DPID. O mesmo tratamento foi adotado com referência ao peso inicial.

Os níveis séricos e urinários de Ca P e PTH foram comparados pelo teste-t. Para verificar correlações entre os marcadores bioquímicos e o ganho de peso foi utilizado o Teste de Correlação Linear de Pearson. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$ e poder $> 90\%$. As análises foram realizadas no sistema *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS), versão 18.0.

6.15 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (nº 100107). Todos os responsáveis pelos participantes do estudo leram e assinaram o Termo de Consentimento Informado (Anexo 2). Nenhuma amostra de sangue foi obtida exclusivamente para a pesquisa. Foi coletado um pequeno volume adicional ao já requerido pela equipe assistencial (40 microlitros).

7 RESULTADOS

7.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram avaliados 30 prematuros, sendo 15 no GC e 15 no GF. Idade gestacional, idade gestacional corrigida no início do estudo, peso de nascimento, gênero e etnia e número de dias em tratamento foram similares. Ainda, os grupos foram homogêneos em número de dias de ventilação mecânica e quanto ao uso de antibióticos anterior à alocação. Transfusão sanguínea por anemia foi realizada em 4 prematuros do GC e 6 do GF. Estes resultados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização da amostra

Variáveis	Grupo						P
	Controle (n=15)			Intervenção (n=15)			
Idade gestacional (semanas)	30,73	±	1,53	30,87	±	1,41	0,806
IG corrigida após randomização	33,76	±	0,63	33,84	±	0,62	0,707
Número de dias em tratamento	25,87	±	3,14	24,73	±	2,18	0,261
Número de dias em Ventilação mecânica	3,13	±	3,87	4,53	±	5,25	0,413
Número de dias com NPT	4,73	±	4,79	6,60	±	6,52	0,379
Gênero*							
- Feminino	8				9		0,864
- Masculino	7				6		
Etnia*							
- Negra	1				2		0,825
- Branca	14				13		
Uso de antibióticos antes da randomização*	8				10		0,710
Transfusão sanguínea antes da randomização*	4				6		0,700

*Variáveis analisadas pelo teste Qui-quadrado e representadas por número de indivíduos. Demais variáveis foram analisadas por Teste-t e representadas através de média e desvio padrão

7.2 GANHO DE PESO E OFERTA DE NUTRIENTES

Foi realizado acompanhamento da oferta diária de nutrientes e não foram encontradas diferenças significativas na média de calorias, cálcio, proteínas, vitamina D e tipo de leite oferecido entre os RNs alocados em cada grupo. Os grupos foram homogêneos em relação ao número de dias em nutrição parenteral total (NPT). Apesar da semelhante oferta nutricional, o ganho de peso diário foi significativamente superior no GF ($p < 0,001$). (Tabela 2).

Tabela 2: Ganho de peso e oferta de nutrientes

Variáveis	Grupo						P*
	Controle (n=15)			Intervenção (n=15)			
Peso Inicial (g)	1472	±	94,18	1373	±	93,84	0,007
Peso final (g)	2034	±	56	2037	±	36,73	0,864
Ganho de peso por dia (g)	20,96	±	4,24	27,43	±	3,73	<0,001
Número de dias com NPT	4,73	±	4,79	6,60	±	6,52	0,379
Energia (calorias/kg/dia)	121,01	±	3,07	118,87	±	3,02	0,07
Oferta de Proteína (g/kg/dia)	3,23	±	0,17	3,22	±	0,17	0,765
Oferta de Cálcio (mg/kg/dia)	164,25	±	6,12	162,09	±	5,24	0,310
Oferta de Fósforo (mg/kg/dia)	85,53	±	1,59	45,40	±	1,35	0,807
Oferta de Vitamina D (UI /dia)	309,96	±	10	310,66	±	10,33	0,852
Tipo de leite*							
- Leite materno fortificado			3			2	0,426
- Fórmula nutricional			2			5	
- Misto			10			8	

*Variáveis analisadas pelo teste Qui-quadrado e representadas por número de indivíduos. Demais variáveis foram analisadas por Teste-t e representadas através de média e desvio padrão

7.3 CARACTERÍSTICAS MATERNAS

Não houve diferença significativa em relação à estação do ano no momento do nascimento ($p=0,71$). Os demais dados maternos e da gestação também foram similares: tabagismo na gestação ocorreu em 2 gestantes do GC e em 3 do GF. Infecção urinária foi diagnosticada em 5 gestantes, sendo 3 no GC e 2 no GF. Pré-eclâmpsia esteve presente em 13

gestações, 8 no GC e 5 no GF. Corticoesteroide antenatal foi utilizado por 2 gestantes do GC e por 3 do GF. Asma foi relatada como doença crônica em uma gestante do GF e não houve nenhum caso de diabetes gestacional ou prévia à gestação, de alcoolismo ou de uso de drogas na amostra estudada. (Tabela 3)

Tabela 3: Características da gestação

Variáveis	Grupo		P
	Controle (n=15)	Fisioterapia (n=15)	
Infeção urinária	3	2	0,624
Tabagismo na gestação	2	3	0,713
Corticóide antenatal	2	3	0,624
Pré-eclâmpsia	6	5	0,705
Estação do ano no parto			
Primavera/verão	7	5	
Outono/Inverno	8	10	0,710

* Variáveis analisadas pelo teste Qui-quadrado e representadas por número de indivíduos

7.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA

7.4.1 Fosfatase alcalina óssea específica

Os níveis de FAO eram similares entre os dois grupos antes de iniciada a intervenção e, uma vez concluído o protocolo, foram significativamente maiores no GF (Tabela 4 e Figura 1). Além disso, na análise intra-grupos, o GF apresentou uma elevação nestes níveis em relação aos valores iniciais ($p < 0,001$). A elevação ocorrida no GC não apresentou significância estatística ($p = 0,286$).

7.4.2 Deoxipiridinolina urinária

Os níveis de DPID antes da intervenção eram significativamente maiores no GF quando comparados ao GC, e após a intervenção os níveis de DPID reduziram no GF e aumentaram no GC, sendo esta diferença significativa. Ou seja, o GF apresentou redução no valor da DPID até o final do estudo, enquanto o GC obteve aumento do mesmo marcador ($p < 0,001$). No final do estudo, a diferença observada entre os grupos foi significativa (Tabela 4 e Figura 2).

No modelo ajustado, utilizando como covariantes a média inicial de DPID e o peso inicial, tanto as médias do ganho em FAO como em DPID permaneceram significativas (Tabela 4).

Houve correlação negativa entre o ganho de peso e os níveis de DPID ($r = -0,64$; $p = 0,001$) (Figura 3). Não houve correlação significativa entre ganho de peso e FAO.

7.4.3 Exames complementares

Os níveis séricos de Ca, P e PTH foram semelhantes entre os grupos antes e após a intervenção. Os resultados das análises bioquímicas são sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4: Avaliação bioquímica do metabolismo ósseo prévia e após protocolo de fisioterapia em prematuros

Variáveis	Grupo		p
	Grupo Controle (15)	Grupo Fisioterapia 15	
DPID (nmol/mmol)			
Inicial	64,13 ± 33,87	104,90 ± 45,77	0,01
Final	131,40 ± 42,79	59,40 ± 31,94	<0,001
Ganho ou Diferença	67,27 ± 50,99	- 45,53 ± 43,80	<0,001
Ganho* (média ajustada para DPID Inicial e peso inicial)	49,94 ± 11,05	-28,21 ± 11,05	<0,001
FAO			
Inicial	108,28 ± 12,86	104,98 ± 19,40	0,588
Final	112,27 ± 13,18	126,31 ± 16,72	0,02
Ganho ou diferença	3,98 ± 13,92	21,33 ± 14,72	0,003
Ganho * (média ajustada para peso inicial)	2,87 ± 3,99	22,44 ± 3,99	0,003
CALCIO sérico (mg/dl)			
Inicial	8,92 ± 0,64	8,95 ± 0,58	0,883
Final	8,93 ± 0,42	8,74 ± 0,53	0,277
FÓSFORO sérico (mg/dl)			
Inicial	6,77 ± 0,89	6,86 ± 0,58	0,737
Final	6,93 ± 0,66	6,87 ± 0,56	0,982
PTH (pg/ml)	N=14	N=15	
Inicial	25,53 ± 3,52	24,24 ± 2,79	0,280
Final	24,77 ± 4,03	24,91 ± 2,56	0,920

*Médias ajustadas por ANCOVA. Demais médias comparadas através de Teste-t. Resultados expressos através de média e desvio padrão.

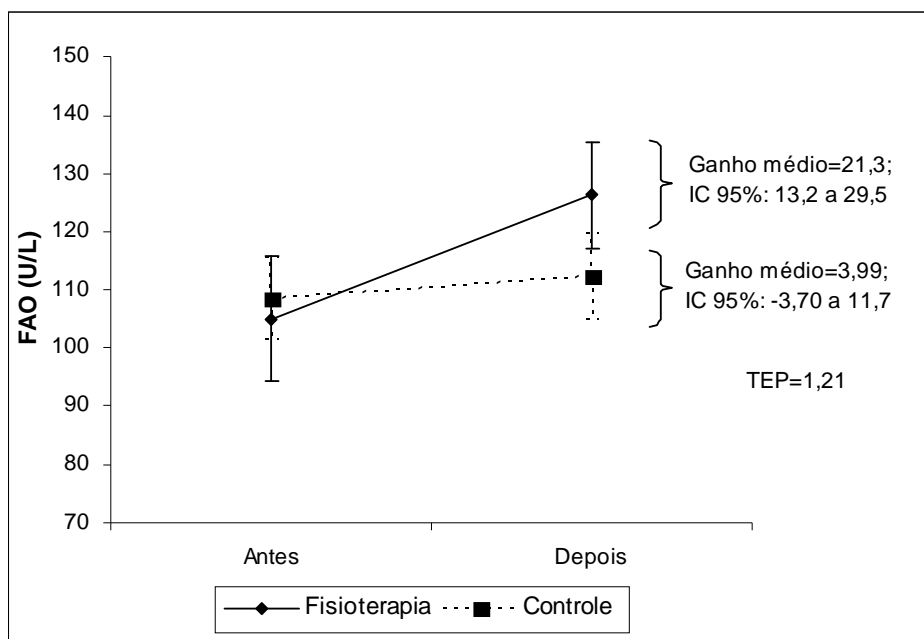


Figura 1: Comparação entre as médias do ganho em FAO no início e final do estudo.

8 DISCUSSÃO

Um protocolo de fisioterapia motora instituído durante o período de internação neonatal, 5 dias por semana, 15 minutos por dia, com movimentos de flexão e extensão passivos e compressões articulares suaves demonstrou efeito benéfico na mineralização óssea. FAO, marcador de formação óssea, apresentou aumento nos dois grupos estudados, porém, este aumento foi significativo apenas no grupo que recebeu a intervenção. O comportamento da DPID mostrou que no GC houve aumento de reabsorção óssea no decorrer do tempo. Já no grupo que recebeu a fisioterapia, esta reabsorção foi reduzida de maneira significativa. O comportamento destes marcadores no decorrer do estudo mostrou, de forma precoce, que o desequilíbrio entre formação e reabsorção observado inicialmente foi atenuado com a intervenção. A desmineralização excessiva, presente nesta fase da vida de RNs prematuros parece ser desacelerada ou interrompida com esta intervenção fisioterapêutica. Além disso, com a mesma oferta diária de nutrientes, o ganho de peso diário foi superior no grupo em que foi instituída fisioterapia motora passiva.

Verificamos que o ganho de peso apresentou significativa correlação negativa com os níveis de DPID. Este achado está de acordo com estudos prévios, e sugere que este ganho relaciona-se com maior quantidade de massa magra e massa óssea, não estando associada apenas com ganho em gordura corporal, e corrobora a conclusão de que, ao ocorrer menor desmineralização óssea, maior será o ganho de peso (MOYER-MILEUR *et al.*, 2000; ELIAKIN *et al.*, 2002; VIGNOCHI *et al.*, 2008).

Em concordância com nossos resultados, estudos que utilizaram massagens associadas com estímulos táteis e cinestésicos em RNs encontraram em curto prazo maior ganho de peso e massa óssea (FIELD, 2002; FIELD *et al.*, 2006; MOYER-MILEUR *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009). Em modelo experimental, os mesmos resultados também foram observados na

idade adulta (CHEN *et al.*, 2009). Vários autores sugerem que estas intervenções modulam a resposta do sistema nervoso autônomo a estressores ambientais, minimizando o impacto negativo do estresse pós-natal sobre o crescimento (FIELD *et al.*, 2006; JUTAPAGDEGUL *et al.*, 2003; PANOGIOTARPOULOS *et al.*, 2004; MOYER-MILEUR *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009; FENOGLIO *et al.*, 2006).

Nemet e colaboradores registraram resultados semelhantes aos do nosso estudo. O grupo intervenção apresentou significativa redução dos níveis de ICTP e do aumento em FAO, porém o aumento no PICP (outro marcador de formação óssea) não alcançou significância estatística (NEMET *et al.*, 2002). A diferença entre FAO e PICP pode ser explicada, uma vez que a FAO tem sido considerada superior para avaliar formação óssea, ao apresentar menos de 10% de reação cruzada com sua isoforma hepática e não ser influenciada pela filtração glomerular (CROFTON, 1999; RAUCH, 1997).

Litmanovitz e colaboradores, de forma similar, avaliaram o efeito da estimulação passiva realizada nas primeiras semanas de vida de recém-nascidos prematuros. Encontraram resultados significativos no aumento da formação e na redução da reabsorção óssea em prematuros que receberam exercícios passivos. No entanto, dosaram a reabsorção através do marcador ICTP, e a diferença observada entre os grupos não foi significativa no final do estudo (LITAMNOVITZ *et al.*, 2003). O marcador DPID foi escolhido para nossa pesquisa por não ser absorvido pelo intestino, podendo ser mensurado sem necessidade de restrição alimentar, tornando seu uso vantajoso em crianças em relação aos demais marcadores de reabsorção. Além disto, sua variabilidade não é afetada pelo elevado *turnover* ósseo, característico desta fase neonatal (COWEL *et al.*, 1993; GFATER *et al.*, 1997; CROFRON *et al.*, 1999).

Outro aspecto a ser discutido refere-se ao tempo de estimulação. Os protocolos das pesquisas citadas reportaram o efeito de 5 a 10 minutos de exercícios passivos ao dia

(MOYER-MILEUR *et al.*, 2000, NEMET *et al.*, 2002; LITMANOVITZ *et al.*, 2003). Em estudo prévio, ao aplicarmos o mesmo protocolo de fisioterapia, os efeitos resultantes de 15 minutos ao dia foram superiores aos obtidos com 5 minutos no ganho de massa óssea, avaliado por DEXA de corpo total (VIGNOCHI *et al.*, 2008). Entretanto, a frequência ideal de estimulação passiva é motivo de questionamento em prematuros. Pesquisadores observaram que prolongada estimulação mecânica leva à dessensibilização da célula óssea (UMEMURA *et al.*, 1997; ROBLING *et al.*, 2001). A formação óssea induzida pela carga foi duas vezes melhor nos grupos que realizaram um período de repouso mínimo de 4 horas. Após 24 horas de repouso 98% da mecanossensibilidade da célula óssea foi recuperada, sugerindo que a resposta osteogênica ao exercício pode ser melhor em regimes que incorporam períodos de repouso entre curtas sessões de exercício de estimulação (UMEMURA *et al.*, 1997).

O crescimento ósseo é influenciado por diversas condições, tais como doenças, uso de medicamentos e pelo tipo de alimentação (MORA *et al.*, 1994; KURL *et al.*, 2002). Para controlar estes fatores podem ser necessários estudos multicêntricos, a despeito da desvantagem de diferentes práticas alimentares entre os centros. Uma possível limitação de nosso estudo é o pequeno tamanho da amostra, no entanto, o fato de ser um estudo unicêntrico, com critérios de seleção e inclusão rigorosos e randomização garantiu uma amostra homogênea na oferta de nutrientes, minerais e suplementação de vitamina D, dado relevante, já que recentemente foi demonstrado que o ganho de peso e o CMO de prematuros se relacionam com adequado equilíbrio ácido-base, propiciado pela administração de suplementos ao leite materno (ROCHOW *et al.*, 2010).

A seleção de nossa amostra foi criteriosa. Foram incluídos prematuros sem doenças associadas diretamente com alteração do metabolismo ósseo, sem necessidade de diuréticos e de ventilação mecânica prolongada, sem dificuldades alimentares e, necessariamente, com

tamanho adequado para idade gestacional. Os prematuros pequenos para a idade gestacional possuem maior tendência para desmineralização, especialmente relacionada com o crescimento intrauterino restrito, e no período pós-natal imediato podem apresentar padrão de crescimento físico ou *catch-up* mais acelerado, necessário para recuperar a trajetória usual de crescimento (NAMGUNG *et al.*, 1993; ALBERTSSON & KALBERG, 1994; CHUNGA *et al.*, 1996).

Aspectos relacionados à sazonalidade foram levados em consideração na análise de nossos resultados. Diferenças relacionadas à sazonalidade são descritas na literatura como importante causa de *deficit* de vitamina D e deficiente mineralização óssea. Gestações ocorridas durante o inverno são relacionadas com menor mineralização óssea ao nascimento (DOCIO *et al.*, 1998; NAMGUNG *et al.*, 1999; BASSIR *et al.*, 2001). Nossos percentuais de prematuros nascidos no inverno e no verão foram semelhantes entre os dois grupos.

Um aspecto relevante e positivo de nosso estudo foi o momento da randomização, uma vez que o elevado *turnover* ósseo no prematuro é demonstrado pela variabilidade dos marcadores bioquímicos com o passar da idade pós-natal. A FAO, diferentemente de outros marcadores, apresenta uma variabilidade significativa nas duas primeiras semanas de vida e, na nossa amostra, os recém-nascidos foram randomizados após este período. Para o marcador DPID, a variabilidade ao longo do tempo não mostrou significância (CROFTON *et al.*, 1999).

Ainda é desconhecido o mecanismo exato que promove a alteração óssea induzida por exercício em RNs prematuros. O protocolo de exercícios fisioterapêuticos utilizados nesta pesquisa incluiu amplitude passiva de movimento com suave resistência ao final da flexão e extensão nas articulações. A carga mecânica gerada causa aumento de pressão na articulação e tensão sobre a musculatura, estimulando a mineralização óssea e promovendo uma cascata de eventos celulares, incluindo a elevação dos níveis de Ca intracelulares e da expressão de fatores de crescimento com consequente aumento da produção de matriz óssea (PENG *et al.*,

1994; FROST, 1996; TURNER, 1998). Segundo Andreoli e colaboradores, a deformação que ocorre nas estruturas envolvidas pode levar a um ótimo nível de formação e a uma inibição da reabsorção que ocorre dentro do ciclo de remodelação óssea normal. Isso indica que, em nível celular, o processo de remodelação induzido pela sobrecarga é realizado pela ação dos osteócitos que atuam como receptores mecânicos do estresse aplicado e liberam um fator químico estimulador da proliferação de osteoblastos no local estressado (ANDREOLI *et al.*, 2001).

Em relação ao exercício na infância, pesquisas mostram que a expansão periosteal ocorre predominantemente durante as fases de crescimento e como consequência, a infância e adolescência fornecem uma janela de oportunidade para melhorar o crescimento periosteal com o exercício. O crescimento periosteal determina a amplitude do perióstio de um osso, que é importante na saúde do esqueleto por duas razões principais. Primeiramente, a adição de osso na superfície periosteal melhora a resistência do osso mais efetivamente à flexão e torção. Em segundo lugar, a reabsorção do osso da superfície periosteal é rara no adulto, cujo local de remodelamento é a superfície trabecular e endocortical (KANNUS *et al.*, 1995). Estas observações indicam que a largura do perióstio permanecerá intacta até a maturidade e, apesar de haver necessidade de estudos de acompanhamento mais longos na população de prematuros, pesquisadores acreditam que exercícios durante períodos de crescimento podem reduzir o risco de fraturas não traumáticas, inclusive nas décadas seguintes (KARLSSON *et al.*, 2002; TURNER, 2005).

No presente estudo, o aumento nos níveis do marcador FAO e, principalmente, a grande redução dos níveis de DPID após protocolo de exercícios ao qual nossa amostra foi submetida, demonstram que o desequilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea parece ser atenuado com a intervenção, especialmente através da desaceleração da reabsorção óssea ocorrida no período de internação pós-natal de RNs prematuros.

CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que uma proposta de intervenção fisioterapêutica aplicada por meio de exercícios passivos realizados 15 minutos por dia, ao longo de quatro semanas, promove maior formação óssea, reduz a reabsorção e ocasiona maior ganho de peso, enquanto a limitação destes movimentos predispõe à reabsorção.

Verificamos que no grupo intervenção a reabsorção óssea analisada pelo marcador DPID foi significativamente reduzida, enquanto a formação óssea analisada pelo marcador FAO elevou-se. Além disso, com mesma oferta diária de nutrientes, o ganho de peso ao dia foi superior no grupo que recebeu o protocolo de fisioterapia motora passiva. Foi possível estabelecer correlação negativa entre o ganho de peso e o marcador DPID, fato que fortalece a conclusão de que, ao ocorrer menor desmineralização óssea, maior será o ganho de peso destes pacientes.

Os benefícios da prevenção e do tratamento da doença metabólica óssea da prematuridade, além de uma alimentação adequada, devem incluir estes exercícios a fim de melhorar a qualidade óssea do prematuro. Estudos de acompanhamento por maior período são necessários para verificar se o efeito protetor do exercício nesta fase persiste na infância e idade adulta.

9 REFERÊNCIAS

1. Alasmi MM, Pickens WL, Hoath SB. Effect of tactile stimulation on serum lactate in the newborn rat. *Ped Res.* 1997;41:857-61.
2. Albertsson-Wikland K, Karlberg J. Natural growth in children born small for gestational age with and without catch-up growth. *Acta Paediatr (Suppl.)*. 1994;399:64-70.
3. Alexander GR, Hines JH, Kafman RB, Mor J, Jogan M. A United States national reference for fetal growth. *Obstet Gynecol.* 1996;87:163-168.
4. Andreoli A, Monteleone M, Van Loan M., Promenzio L, Tarantino U, De Lorenzo A. Effects of different sports on bone density and muscle mass in highly trained athletes. *Obst Gynecol.* 2001;33:507-11.
5. Backstrom MC, Kuusela AL, Maki R. Metabolic bone disease of prematurity. *Ann Med.* 1996;28:275-82.
6. Backström M.C, Mäki R, Kuusela AL, Sievänin H, Koivisto AM, Koshinen M. The long-term effect of early mineral, vitamin D, and breast milk intake on bone mineral status in 9-11-year old children born prematurely. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999;29:575-582.
7. Bayramoglu M, Sozay S, Karatas M, Kilinc S. Relationships between muscle strength and bone mineral density of three body regions in sedentary postmenopausal women. *Rheumatol Int.* 2005;25:513-7.
8. Barendolts EI, Lathon PV, Curry DJ, Kukreja SC. Effects of endurance exercise on bone histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. *Rheumatol Int.* 1994;26:133-40.
9. Bassir M, Laborie S, Lapillonne A, Claris O, Chappuis MC, Salle BL. Vitamin D deficiency in Iranian mothers and their neonates: a pilot study. *Acta Paediatr.* 2001;90:577-9.

10. Beyers N, Alheit B, Taljaard JF, Hall JM, Hough SF. High turnover osteopenia in preterm infants. *Bone*. 1994;15:5–13.
11. Bourrin S, Palle S, Genty C, Alexandre EC. Physical exercise during remobilization restores a normal bone trabecular network after tail suspension-induced osteopenia in young rats. *Rheumatol Int*. 1995;10:820-8. 12 Bishop, N.J. Metabolic bone disease. In: Rennie JM, Robertson NRC. *Textbook of Neonatology*. 3rd ed. London: Churchill Livingstone, 1999, p. 1002–1008.
12. Bishop NJ. Bone disease in preterm infants. *Arch Dis Child*. 1989;62:1403-9.
13. Brown KH, Stalligs RY, Kanashiro HC. Effects of common illnesses on infants energy intakes from breast milk and other foods during longitudinal community-based studies in Lima, Peru. *Am J Clin Nutr*. 1990;52:1005-1013.
14. Brooke OG, Lucas A. Metabolic bone disease in preterm infants. *Arch Dis Child*. 1985;60:682-85.
15. Chan GM, Armstrong C, Moyer-Mileur L, Hoff C. Growth and bone mineralization in children born prematurely. *J Perinatol*. 2008;28(9):619-23.
16. Chatterjee D, Chatterjee-Chakraborty M, Rees S, Cauchi J, Medeiros C B, Fleming AS. Maternal isolation alters the expression of neural proteins during development: “Stroking” stimulation reverses these effects *Arch Dis Child*. 2007;158:11-27.
17. Chen HS, Miller J, Shaw, L, Moyer-Mileur. Massage therapy during early postnatal life promotes greater lean mass and bone growth, mineralization, and strength in juvenile and young adult rats. *Arch Dis Child*. 2009;9(4):278-287.
18. Chunga Vega F, Gomez de Tejada MJ, Gonzalez Hachero J, Perez Cano R, Coronel Rodriguez C. Low bone mineral density in small for gestational age infants: correlation with cord blood zinc concentrations. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 1996;75:126-9.

19. Colwell A, Russell RG, Eastell R. Factors affecting the assay of urinary 3-hydroxypyridinium cross links of collagen as markers of bone resorption. *Eur J Clin Invest.* 1993;23:341-9.
20. Creighton, Morgan AL, Boardley D, Brolinson PG. Weight-bearing exercise and markers of bone turnover in female athletes. *J Appl Physiol.* 2001;90:565-70.
21. Crofton PM, Shrivastava A, Wade JC, Stephen R, Kelnar CJH, Lyon A, McIntosh N. Bone and collagen markers in preterm infants: relationship with growth bone mineral content over the first 10 weeks of life. *Pediatr Res.* 1999;46(5): 581- 7.
22. Dabezies EJ, Warren PD. Fractures in very low birth weight infants with rickets. *Clin Orthop Relat Res.* 1997;335:233–239.
23. Demarini S, Specker BL, Sierra RI, Miodovnik M & Tsang RC. Evidence of increased intrauterine bone resorption in term infants of mothers with insulin-dependent diabetes. *J Pediatr.* 1995;126:796–798.
24. Demarini S, Mimouni FB, Tsang C. Disorders of calcium, phosphorus, and magnesium metabolism. In: Fanaroff AA, Martin RJ. *Neonatal-Perinatal Medicine: Diseases of the Fetus and Infant*, 6th ed. St Louis: Mosby, 1997, p. 1473.
25. Docio S, Riancho JA, Perez A, Olmos JM, Gonzalez-Macias J. Seasonal deficiency of vitamin D in children: a potential target for strategies? *J Bone Miner Res.* 1998;13:544-8.
26. Eliakin A, Dolfin T, Weiss E, Kestenbaum R, Lis M, Nemet D. The Effects of Exercise on Body Weight and Circulating Leptin in Premature Infants. *J Perinatol.* 2002;22:550-554.
27. Farek J, Petersen B, Petersen S, Michaelsen KF. Bone mineralization in premature infants cannot be predicted from serum alkaline phosphatase or serum phosphate. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 2002;87:133-6.

28. Fenoglio KA, Chen Y, Baram TZ. Neuroplasticity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis early in life requires recurrent recruitment of stress-regulating brain regions. *J Neurosci.* 2006;26:2432-42.
29. Fewtrell MS, Williams J, Singhal A, Murgatroyd PR, Fuller M, Lucas A. Early diet and peak bone mass: 20 year follow-up of a randomized trial of early diet in infants born preterm. *Bone.* 2009;45:142-9.
30. Field T. Preterm infant massage therapy studies: An American approach. *Semin Neonatol.* 2002;7:487-94.
31. Field T, Diego MA, Hernandez-Reif M, Deeds O, Figuereido B. Moderate versus light pressure massage therapy leads to greater weight gain in preterm infants. *Infant Behav Dev.* 2006;29:574-8.
32. Forbes GB. Calcium accumulation by the human fetus. *Pediatrics.* 1976;57:975-6.
33. Frost HM. Perspectives: a proposed general model of the "mechanostat" (suggestions from a new paradigm). *Anat Rec.* 1996;244(2):139-47.
34. Frost HM. From Wolff's law to the Utah paradigm: insights about bone physiology and its clinical applications. *Anat Rec.* 2001;262:398-419.
35. Gfatter R, Braun F, Herkner K, Kohlross C, Hackl P. Urinary excretion of pyridinium crosslinks and N-terminal crosslinked peptide in preterm and term infants. *Int J Clin Lab Res.* 1997;27:238-243.
36. Greer FR. Osteopenia of prematurity. *Annu Rev Nutr.* 1994;14:169-85.
37. Greer FR, MMcCormick A. Bone growth with low bone mineral content in very low birth weight preterm infant. *Pediatr Res.* 1986;20(10):925-28.
38. Harrast SD & Kalkwarf HJ. Effects of gestational age, maternal diabetes, and intrauterine growth retardation on markers of fetal bone turnover in amniotic fluid. *Calcif Tissue Int.* 1998;62:205-208.

39. Hernandez-Reif M, Diego M, Field T. Preterm infants show reduced stress behaviors and activity after 5 days of massage therapy. *Infant Behav Dev.* 2007;30:557-61.
40. Hillman L. Bone mineral acquisition in uterus and during infancy and childhood. In: Riggs BL, Melton LJ, eds. *Osteoporosis: etiology, diagnosis and treatment.* 2nd ed. Philadelphia: Lippincot-Raven; 1996, p.449-64.
41. Hori C, Tsukahara H, Fujii Y, Kawamitsu T, Konishi Y, Yamamoto K, et al. Bone mineral status in preterm-born children: assessment by dual-energy X-ray absorptiometry. *Biol Neonate.* 1995;68:254-8.
42. Horsman A, Ryan SW, Congdon PJ, Truscott JG, Simpson M. Bone mineral accretion rate and calcium intake in preterm infants. *Archives of Disease in Childhood.* 1989;64:910-918.
43. Hubert W, Vesper A, Larence M, Demers RE, Garner P, Kleerekoper M, Robins SP. Assessment and Recommendations on Factor Contributing to Preanalytical Variability of Urinary Pyridinoline and Deoxypyridinoline. *Clin Chemistry.* 2002;48(2): 220-235.
44. Husain SM, Birdsey TJ, Glazier JD, Mughal MZ, Garland HO & Sibley CP. Effect of diabetes mellitus on maternofetal flux of calcium and magnesium and calbindin9K mRNA expression in rat placenta. *Pediatr Res.* 1994;35:376–381.
45. Jobe AH, Bancalarie E. Workshop summary on bronchopulmonary dysplasia. *Am J Resp Crit Care Med.* 2001;163:1723-29.
46. Jones G, Riley M & Dwyer T. Maternal smoking during pregnancy, growth, and bone mass in prepubertal children. *J Bone Min Res.* 1999;14:146-151.
47. Jutapakdeegul N, Casalotti SO, Govitrapong P, Kotchabhakdi N. Postnatal touch stimulation acutely alters corticosterone levels glucocorticoid receptor gene expression in the neonatal rat. *Dev Neurosci.* 2003;25:26-33.

48. Yeh JK, Aloia JF, Yamasura S. Effect of physical activity on calcium and phosphorus metabolism in the rat. *Am J Physiol.* 1989;256:1-6.
49. Kamel S, Brazier M, Picard C, Boitte F, Samson L, Desmet G, Sebert J. Urinary excretion of pyridinolines crosslinks measured by immunoassay and HPLC techniques in normal subjects and in elderly patients with vitamin D deficiency. *Bone Miner.* 1994;16:197.
50. Kannus P, Haapasalo H, Sankelo M, et al. Effect of starting age of physical activity on bone mass in the dominant arm of tennis and squash players. *Ann Intern Med.* 1995;123:27-31.
51. Karlsson MK, Ahlborg H, Obrant KJ et al. Exercise during growth and young adulthood is associated with reduced fracture risk in old ages. *J Bone Miner Res.* 2002;17(1):297.
52. Keiver K, Herbert L & Weinberg J. Effect of maternal ethanol consumption on maternal and fetal calcium metabolism. *Alcohol Clin and Exp Res.* 1996;20,1305-1312.
53. Koo WW, Sherman R, Succop P, Ho M, Buckley D, Tsang RC. Serum vitamin metabolites in very low birth-weight infants with and without rickets and fractures. *J Pediatr.* 1989;114(6):1017-22.
54. Koo WWK, Tsang RC. Calcium, magnesium, phosphorus and vitamin D. In: Tsang RC, Lucas A, Uauy R, Zlotkin S. Nutrition needs of the preterm infant. Scientific basis and practical guidelines. Baltimore: Williams & Wilkins; 1993, p.135-55.
55. Koo WK, Hockman EM, Hammami M. Dual energy X-Ray absorptiometry measurements in small subjects: Conditions affecting clinical measurements. *J Am Coll Nutr.* 2004;23(3):212-9.
56. Kovacs CS, Kronenberg HM. Skeletal physiology: pregnancy and lactation. In: Favus MJ, ed. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 6th edition. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research 2006, p.63-68.

57. Kovar I, Mayne P, Barltrop. Plasma alkaline phosphatase activity: a screening test for rickets in preterm infants. *Lancet*. 1982;1:308-310.
58. Kuhn CM, Shamberg SM, Field T, Symansky R, Zimmerman E, Scafidi F, Roberts J. Tactile-kinesthetic stimulation effects on sympathetic and adrenocortical function in preterm infants. *J Pediatr*. 1991;119(3):434-40.
59. Kurl S, Heinonen K, Lausimies E. Pre and post-discharge feeding of very preterm infants: impact on growth and bone mineralization. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2003;23:182-9.
60. Kuschel CA, Harding JE. Multicomponent fortified human milk promoting growth in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;1:CD000343.
61. Larsen, WJ. *Essentials of Human Embryology*. Churchill Livingstone, New York, 1998, p. 207–216.
62. Larson CM, Henderson RC. Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop*. 2000;20:71-74.
63. Lingen RA, Simons SHP, Anderson BJ, Tibboel D. The effects of analgesia in vulnerable infant during the perinatal period. *Clin Perinatol*. 2002;29(3):511-34.
64. Litmanovitz I, Dolfen T, Arnons S, Regev RH, Nemet D, Eliakin A. Early physical activity prevents decrease of bone strength on very low birth weight infants. *Pediatrics*. 2003; 112(1): 15-9.
65. Mayne PD, Kovar IZ. Calcium and phosphorus metabolism in the premature infant. *Ann Clin Biochem*. 1991;28:131-42.
66. Mackelvie KJ, Petit MA, Khan KM, Beck TJ, McKay. Bone mass and structure are enhanced following a 2-year randomized controlled trial of exercise in prepubertal boys. *Bone*. 2004;34:755-65.
67. Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, Sharma S, Seckl JR, Plotsky PM. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene

- expression: Implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci*. 1996;18:49-72.
68. McIntyre L, Specker BL, Hudson P. Effect of exercise on bone mineral content in infants 1 to 15 months of age. *Pediatr Res*. 1992;31:97.
69. Melhus H, Michalsson K, Holmberg L, Wolk A & Ljunghall S. Smoking, antioxidant vitamins, and the risk of hip fracture. *J Bone Min Res*. 1999;14:129–135.
70. Menkes A, Mazel S, Redmond RA, Koffler K, Libanati CR, Gundenberg CM. et al. Strength training increases regional bone mineral density and bone remodeling in middle-aged and older men. *J Appl Physiol*. 1993;74:2478-84.
71. Miller ME. The bone disease of preterm birth: a biomechanical perspective. *Pediatr Res*. 2003;53(1):10-5.
72. Moyer-Mileur L, Brunstetter V, Mcnaught PT, Gill G, Chan GM. Daily physical activity program increases bone mineralization and growth in preterm very low birth weight infants. *Pediatrics*. 2000;106:1088-92.
73. Moyer-Mileur L, Luetkemier M, Boomer L, Chan GM. Effect of physical activity on bone mineralization in premature infants. *J Pediatr*. 1995;127(4):620-25.
74. Moyer-Mileur LJ, Ball SD, Brunstetter VL, Chan GM. Maternal-administered physical activity enhances bone mineral acquisition. *J Perinatol*. 2008;28:432-7.
75. Mora S, Weber G, Belini C, Chiumello G. Bone modeling alteration in preterm infants. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1994;148:1017-21.
76. Namgung R, Tsang RC, Specker BL, Sierra RI, Ho ML. Reduced serum osteocalcin and 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations and low bone mineral content in small for gestational age infants: Evidence of decreased bone formation rates. *J Pediatr*. 1993;122:269-275.

77. Namgung R, Tsang RC, Lee C, Han DG, Ho ML, Sierra RI. Low total body bone mineral content and high bone resorption in Korean winter-born versus summer-born newborn infants. *J Pediatr* 1999;134:125-6.
78. Nemet D, Dolfen T, Litmanowitz I, Shainkin-Kestenbaum R, Lis M, Eliakim A. Evidence for exercise induced bone formation in premature infants. *Int J Sports Med*. 2002;23(3):82-5.
79. Panogiotarpoulos T, Papaioannou A, Pondiki S, Prokopiou A, Stylianopoulou F, Gerozissis K. Effect of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. *J Neuroendocrinol*. 2004;79:109-18.
80. Peng Z, Tuukanen H, Zhang H, Jamsa T. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. *Bone*. 1994;15:523-32.
81. Pereira GR, Geongleff MK. Nutricional Assessment In:Fetal and Neonatal Physiology 2nd.Philadelphia :W B. Saunders Company. 1998, p. 383-394.
82. Petteri H, Anderson S, Jarvenpa AL. Decreased Bone Mineral Density in Adults Born with Very Low Birth Weight: A Cohort Study. *PLOS Med*. 2009;6(8):1-10.
83. Pitukcheewanont P, Punyasavatsut N, Feuille M. Physical activity and bone health in children and adolescents. *Ped endocrinol*. 2010;7(3):275-82.
84. Price CP. Multiple forms of human serum alkaline phosphatase: detection and quantitation. *Ann Clin Biochem*. 1993;30:355-372.
85. Rauch F, Schoenau E. Skeletal development in premature infants a review of bone physiology beyond nutritional aspects. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* . 2002;86(2):F82-F85.
86. Rauch F, Schoneau E, Woitge H, Remer T, Seibel M. Urinary ex-cretion of hydroxy-pyridinium cross-links of collagen reflects skeletal growth velocity in normal children. *Exp Clin Endocrinol*. 1994;102:94.

87. Rauch F, Middelmann I, Cagnoli M. Comparison of total alkaline phosphatase and three assays for bone-specific alkaline phosphatase in childhood and adolescence. *Acta Paediatr.* 1997;86:583-7.
88. Rautava E, Lehtonen-Veromaa M, Kautiainen H, Kajander S, Heinonen O J, Viikari J, Möttönen T. The reduction of physical activity reflects on the bone mass among young females: a follow-up study of 142 adolescent girls. *Osteoporos Int.* 2007;18:915-922.
89. Rigo J, De Curtis M, Pieltain C. Nutritional assessment in preterm infants with special reference to body composition. *Semin Neonatol.* 2001;6:383-391.
90. Rigo J, De Curtis M, Pieltain C, Picaud JC, Salle B, Senterre J. Bone mineral metabolism in the micropremie. *Clin Perinatol.* 2000;27:147-70.
91. Robling AG, Burr DB, Turner CH. Recovery periods restore mechanosensitivity to dynamically loaded bone. *J Exp Biol.* 2001;204(19):3389-99.
92. Rodriguez JI, Palacios J, Garcia-Alix A, Pastor I, Paniagua R Effects of immobilization on fetal bone development: a morphometric study in newborns with congenital neuromuscular diseases with intrauterine onset. *Calcif Tissue Int.* 1988;43:335-9.
93. Rodriguez JI, Palacios J, Ruiz A, Sanchez M, Alvarez I, Demiguel E. Morphological changes in long bone development in fetal akinesia deformation sequence: an experimental study in curarized rat fetuses. *Teratology,* 1992;45:213-21.
94. Rodriguez JI, Palacios J. Pathogenetic mechanisms of fetal akinesia deformation sequence and oligohydramnios sequence. *Am J Med Genet.* 1991;40:284-289.
95. Rochow N, Jochum F, Redlich A, Korinekova Z, Linnemann I K, Weitmann K, Boehm G, Muller H, Kalhoff H, Topp H, Hoffman W, Fusch C. Fortification of breast milk in VLBW infants: Metabolic acidosis is linked to the composition of fortifiers and weight gain and bone mineralization. *Clin Nutr.* 2010:1-7, doi:10.106/j.clnu.2010.07.016 (Article in press)

96. Riggs BL. Overview of osteoporosis. *West. J. Med.* 1991;154:63-77.
97. Ryan SW, Truscott J, Simpson M, James J. Phosphate, alkaline phosphatase and bone mineralization in preterm neonates. *Acta Paediatr.* 1993;82:518-521.
98. Sampson HW, Perks N, Champney TH & DeFee B II. Alcohol consumption inhibits bone growth and development in young actively growing rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996;20:1375-1384.
99. Saraiva LG, Lazaretti-Castro M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. *Arq bras endocrinol metab.* 2002;46(1):72-8.
100. Scafidi FA, Field T, Schanberg SM. Factors that predict which preterm infants benefit most from massage therapy. *J Dev Behav Pediatr.* 1993;14:176-80.
101. Schoenau E, Land C. Fetal and postnatal bone development: reviewing the role of mechanical stimuli and nutrition. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008;22(1):107-18.
102. Shulzke SM, Trachsel D, Patole SK. Physical activity programs for promoting bone mineralization and growth in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010, Issue 2. Art. No.: CD005387. DOI: 10.1002/14651858.CD005387.pub2
103. Seyedin S, Kung V, Daniloff Y, Hesley R, Gomez B, Nielsen L, Rosen H, Zuk R. Immunoassay for urinary pyridinoline: the new marker of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 1993;8:635-640.
104. Specker BL, Mulligan LHOM. Longitudinal study of calcium intake, physical activity and bone mineral content in infants 6-18 months of age. *J Bone Miner Res.* 1999;14(4):569-576.
105. Termine JD, Robey PG. Bone matrix proteins and the mineralization process. In: Favus MJ, ed. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996, p.24-28.

106. Trindade EPC. Importância dos minerais na alimentação do pré-termo extremo. *J Pediatr (RJ)*, 2005;81(1): 43-51.
107. Tubbs RS, Webb D, Abdullatif H, Conklin M, Doyle S, Oakes WJ. Posterior cranial fosse volume in patients with rickets: insights into the increased occurrence of Chiari malformation in metabolic bone disease. *Neurosurgery*. 2004;55:380-3.
108. Turner CH. Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. *Bone*. 1998;23:399-407.
109. Turner CH, Robling AG. Exercises for improving bone strength. *Br J Sports Med*. 2005;39(4):188-9.
110. Umemura Y, Ishiko T, Yamauchi T. Five jumps per day increase bone mass and breaking force in rats. *J Bone Miner Res*. 1997;12:1480-5.
111. Van Oers HJ, Kloet ER, Whelan T, Levine S. Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. *J Neurosci*. 1998;18:10171-79.
112. Vieira JGH. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq bras endocrinol metab*. 1999;43(6):415-22.
113. Vickers A, Ohlsson A, Lacy JB, Horsley A. Massage for promoting growth and development of preterm and/or low birth-weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;2:CD000390.
114. Vignochi CM, Miura E, Canani LH. Effects of motor physical therapy on bone mineralization in premature infants: a randomized controlled study. *J Perinatol*. 2008;28:624-31.
115. Watts NB. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clin Chem*. 1999;45:1359-68.

116. Weiler HA, Yuen CK, Seshia MM. Growth and bone mineralization of young adults weighing less than 1500 g at birth. *Early Hum Dev.* 2002;67:101-12.

ANEXO 1 - Formulário para registro de dados

Grupo:
Registro número:

1 DADOS MATERNOS

Idade:
Data do parto:
Medicamentos:
Tabagismo na gestação;
Álcool:
Drogas:
Problemas de saúde:
Endereço:
Telefone:
Nome e endereço e telefone de vizinho, amigo ou familiar:
Número de filhos:
Estado civil:
Renda familiar:
Telefone para recados:

2 AVALIAÇÃO DOS PACIENTES

Número de registro:
Data de nascimento:
 Gênero:
 Etnia:
Idade Gestacional:
Idade Gestacional Corrigida na Entrada:
Peso ao nascer:
Idade no início do protocolo:
Comprimento ao nascer:
Perímetro cefálico:

APGAR 1 e 5

História clínica antes da entrada no protocolo:
 Intercorrências durante o estudo

3 REGISTROS ANTROPOMÉTRICOS REGULARES E OFERTA DE NUTRIENTES:

GRUPO:																									
REGISTRO NÚMERO:																									
Peso ao Nascimento																									
DIAS		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
Peso (g)																									
Ganho de Peso/Dia																									
COMPRIMENTO (cm)	TOTAL																								
	TIBIAL																								
	RADIAL																								
Per. Cef																									
ALIMENTAÇÃO	Tipo ¹																								
	Via ²																								
	Cal/kg/dia																								
	Quantidade/kg/dia																								
	Proteína (g/Kg/dia)																								
	Cálcio (mg/Kg/dia)																								
	Fósforo (mg/kg/dia)																								
	Magnésio (mg/Kg/dia)																								
	Vitamina D (UI/dia)																								

¹ 1 = leite materno; 2 = fórmula infantil

² 1 = COPO; 2 = SNG; 3 = SNE; 4 = SM

ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da pesquisa:

ANÁLISE DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS DEOXIPIRIDINOLINA URINÁRIA E FOSFATASE ALCALINA ÓSSEA ESPECÍFICA NO METABOLISMO ÓSSEO DE RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO SUBMETIDOS À FISIOTERAPIA MOTORA

Justificativa e objetivos: Prematuros com baixo peso possuem grande risco de desenvolver fragilidade óssea por não ter completado todo seu desenvolvimento ósseo dentro do útero. Este problema pode continuar na infância com risco de fraturas.

O objetivo desta pesquisa, portanto é de avaliar se os exercícios realizados pelo fisioterapeuta podem melhorar a qualidade óssea, crescimento e ganho de peso do seu bebê, pois já se sabe de pesquisas anteriores que a pouca movimentação pode aumentar essa tendência a ter ossos menos resistentes.

Procedimentos a serem utilizados nos bebês que forem sorteados para o grupo de tratamento:

O seu bebê fará exercícios leves, suaves nos braços e pernas realizados por um fisioterapeuta.

Estes exercícios serão iniciados quando a criança estiver bem, e serão realizados uma vez ao dia, cinco dias por semana até seu filho completar 2 quilos.

Para comprovar que esses exercícios podem melhorar a qualidade dos ossos do seu bebê e melhorar seu peso e crescimento, faremos exames simples de sangue e urina, que também serão coletados antes do início dos exercícios e aos 2 quilos e irão auxiliar na análise dos nossos resultados. Para podermos divulgar o modo de realizar os exercícios precisaremos fotografar ou filmar o seu bebê realizando-os, para isso também precisaremos da sua autorização para o uso das imagens, lembrando que as mesmas não mostrarão o rosto nem mesmo divulgarão o nome do seu bebê.

Se o seu bebê não for sorteado, ele não irá realizar este tratamento fisioterapêutico, porém, não deixará de receber todo tratamento médico e fisioterapêutico que já está sendo realizado. Neste caso fará apenas os exames utilizados para avaliar como está o crescimento e desenvolvimento ósseo do seu bebê.

Desconfortos ou riscos esperados: Os exames serão coletados na rotina assistencial do prematuro, não haverá, portanto, desconforto adicional ao já experimentado decorrente das punções obrigatórias assistenciais. Os exercícios realizados não trazem nenhum risco para seu bebê.

Benefícios que se pode obter: Outros pesquisadores que realizaram pesquisas parecidas conseguiram sugerir alguns benefícios na realização dos exercícios. Esses benefícios incluem melhor desenvolvimento, melhor ganho de peso e crescimento e melhora da qualidade e resistência dos ossos.

Custos: A pesquisadora dá garantia de que nenhum custo referente à pesquisa será de responsabilidade dos responsáveis.

É ressaltado que a concordância em participar deste estudo não implica em modificação do tratamento que está sendo feito para seu filho. Da mesma forma, a não concordância em participar deste estudo não irá alterar o tratamento já estabelecido.

Eu _____(responsável) fui informado dos objetivos da pesquisa de maneira clara e detalhada. Recebi informações a respeito do estudo e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão assim que eu desejar

Os pesquisadores Carine Vignochi e Rita de Cássia Silveira certificaram-me que todos os dados da pesquisa são confidenciais e terei liberdade de tirar meu consentimento de participação desta pesquisa caso desejar.

Se houver novas dúvidas sobre este estudo, posso chamar Carine Vignochi pelo telefone 84496605 para qualquer esclarecimento sobre meus direitos e do meu filho como participantes deste estudo.

Declaro que recebi cópia do Presente Termo de Consentimento.

Assinatura do responsável

Nome

Data

ARTIGO – VERSÃO EM PORTUGUÊS

FISIOTERAPIA MOTORA PASSIVA REDUZ A REABSORÇÃO E AUMENTA A FORMAÇÃO ÓSSEA EM RECÉM-NASCIDOS PREMATUROS.

RESUMO

Introdução: Recém-nascidos pré-termo hospitalizados costumam receber manuseio mínimo com objetivo de protegê-los de estresse. Como resultado desta inatividade pode ocorrer aumento da reabsorção óssea e desmineralização. **Objetivo:** Avaliar a formação óssea de recém-nascidos pré-termos, antes e após um protocolo de fisioterapia motora, por meio dos marcadores bioquímicos fosfatase alcalina óssea específica (FAO) e deoxipiridinolina urinária (DPID). **Método:** Ensaio clínico controlado e randomizado incluiu 30 recém-nascidos pré-termos com idades gestacionais iguais ou inferiores a 35 semanas e peso adequado para a idade gestacional (AIG) randomizados em grupo controle (GC) e grupo fisioterapia (GF). No GF foi aplicado o protocolo de fisioterapia motora que consistiu de 15 minutos diários de movimentos passivos com compressões articulares suaves, cinco dias por semana. Diariamente foram obtidos dados sobre alimentação e peso corporal. FAO e DPID foram coletados após a randomização e após quatro semanas de intervenção, em ambos os grupos. Foi realizado teste de ANCOVA para comparar as médias dos dois grupos. **Resultados:** No início do estudo, a idade gestacional e idade gestacional corrigida, peso de nascimento e gênero foram similares entre os grupos. Na oferta de nutrientes, tempo de uso de Nutrição Parenteral total (NPT) e Ventilação mecânica os grupos foram homogêneos. No GF o aumento nos níveis de FAO foi de $22,44 \pm 3,49$ U/L após a intervenção, ao passo que o GC apresentou aumento de $2,87 \pm 3,99$ U/L ($p=0,003$). No GF houve redução nos níveis de DPID de $28,21 \pm 11,05$ nmol/mmol, enquanto no GC houve aumento de $49,95 \pm 11,05$ nmol/mmol ($p \leq 0,001$). **Conclusão:** Uma proposta de intervenção fisioterápica aplicada por meio de exercícios passivos e por um curto período de tempo (15 minutos), diariamente ao longo das quatro semanas, resulta em efeitos favoráveis ao metabolismo ósseo dos recém-nascidos prematuros. Os benefícios da prevenção e do tratamento da doença metabólica óssea da prematuridade, além de uma alimentação adequada, devem incluir estes exercícios passivos com suaves compressões articulares a fim de melhorar a qualidade óssea do prematuro.

Palavras-chave: Prematuro. Marcadores bioquímicos. Fisioterapia. Osteopenia.

Introdução

A interação entre a oferta de minerais, a atividade dos hormônios calciotrópicos e os movimentos fetais contra a parede uterina, é essencial para o apropriado desenvolvimento do esqueleto intrauterino^{1,2}. A nutrição pós-natal do recém-nascido prematuro procura melhorar a mineralização, não se igualando, no entanto, à oferta intrauterina. Para uma formação óssea extrauterina adequada em são necessárias ofertas similares de Ca e P correspondentes ao terceiro trimestre gestacional. Entretanto, é difícil ofertar no ambiente extrauterino, através da alimentação, os níveis possíveis pela via placentária². Como consequência ocorre aumento da fragilidade óssea, suscetibilidade para fraturas e distúrbios de crescimento, denominados osteopenia da prematuridade. Observa-se que estas alterações podem perdurar no decorrer da infância e da idade adulta^{3,4,5}.

O cuidado padrão de recém-nascidos prematuros em unidades de terapia intensiva em geral consiste na restrição da estimulação sensorial e física como forma de manter a estabilidade e reduzir o estresse pós-natal⁶. Os prematuros hospitalizados costumam receber, portanto, limitada estimulação motora. O resultado desta inatividade e a dificuldade de oferta de minerais colaboram para a inadequada estimulação do metabolismo ósseo^{7,8,9,10}.

Existem evidências de que as forças mecânicas nos ossos estimulam a formação e o crescimento, enquanto a inatividade predispõe à reabsorção^{7,11}. Estudos em crianças e adultos têm sugerido que programas de exercícios regulares podem ser uma intervenção simples que promovem melhor mineralização óssea e crescimento e têm sido utilizados como parte do tratamento e da prevenção da osteopenia em diferentes estágios da vida, por induzir os osteoblastos a aumentarem sua atividade em resposta à sobrecarga mecânica^{9,12,13,14}.

Nos últimos anos, pesquisadores têm sugerido que 5 minutos de estimulação passiva diária resulta em aumento de densidade mineral óssea em recém-nascidos prematuros^{15,16,17}. No entanto, de acordo com recente revisão sistemática, as evidências atuais ainda não

suportam seu uso rotineiro. As diferentes formas de avaliação da mineralização óssea e as limitações metodológicas tem limitado estes resultados¹⁸.

Nosso grupo de pesquisas publicou em 2008 o efeito de 15 minutos de exercícios aplicados 5 vezes por semana através de *dual X-ray absorptiometry* (DEXA) de corpo total. Os resultados demonstraram aumento de conteúdo mineral ósseo (CMO), fato que colabora na constatação de que o exercício passivo no pré-termo é um importante instrumento na mineralização óssea e na prevenção da osteopenia da prematuridade. Contudo, não foram dosados marcadores bioquímicos¹⁹. Através da medida de CMO e DMO, podemos verificar, apenas, se existe menor quantidade óssea produzida. A análise bioquímica permite conhecer, de forma conjunta, se a falha na mineralização ocorreu por escassez de formação ou se houve reabsorção exacerbada, propiciando, portanto, avaliar de forma dinâmica as alterações ósseas mais recentes, antes de representarem perdas em gramas de mineral ósseo e se o desequilíbrio pode ser atenuado ou revertido pela intervenção fisioterapêutica²⁰.

Material e Método

Ensaio clínico controlado e randomizado realizado na UTI Neonatal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) incluindo recém nascidos prematuros com idades gestacionais iguais ou inferiores a 35 semanas, adequados para a idade gestacional (AIG), hemodinamicamente estáveis e em condições de receber alimentação enteral suficiente para proporcional oferta média calórica de 110 ml/kg ao dia. Foram excluídos aqueles recém-nascidos em ventilação mecânica no momento da randomização, hemorragia periventricular graus 3 e 4, displasia broncopulmonar, doenças neurológicas, malformações congênicas e síndromes genéticas e que estivessem em uso de diuréticos ou corticosteróides.

A alimentação enteral dos pacientes constituiu em leite materno suplementado ou fórmula infantil na impossibilidade de ofertar leite materno.

Randomização

Para a randomização foi gerada uma seqüência de números aleatórios. Uma pessoa não envolvida na pesquisa realizou a alocação dos grupos. Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão, no momento que estavam tolerando alimentação enteral de 110 kcal/kg ao dia, foram randomizados para grupo controle (GC) ou grupo fisioterapia (GF). Ambos receberam o mesmo cuidado de rotina assistencial, além de colo e ou carinho materno. O GF, além destes cuidados, recebeu o protocolo descrito a seguir.

Protocolo de exercício fisioterapêutico

A pesquisadora realizou diariamente a intervenção fisioterapêutica, cinco dias por semana, 15 minutos ao dia, que foi realizada no mínimo 30 minutos após o paciente receber a alimentação e foi interrompida no momento em que o recém-nascido atingiu 2000 gramas (momento da alta hospitalar). Os exercícios realizados foram movimentos de flexão e extensão passivos com compressões articulares suaves ao final de cada movimento. Foram realizadas 10 repetições nos punhos, cotovelos, ombros, tornozelos, joelhos e quadris, em decúbitos laterais direito e esquerdo.

Variáveis principais

Fosfatase alcalina óssea específica (FAO): Marcador de formação óssea

As amostras de sangue foram coletadas após a randomização e na alta hospitalar, sempre no turno da manhã, e em seguida foram armazenadas em freezer com temperatura de -80° C, no centro de pesquisas do HCPA. Para a análise foi realizado o ensaio METRA-BAP-QUIDEL, através do método ELISA. Todas as amostras foram mensuradas em duplicata, sendo utilizado o valor da média dos ensaios. Os resultados foram expressos em

U/L. Nenhuma amostra de sangue foi obtida exclusivamente para a pesquisa. Foi coletado um volume adicional ao já requerido pela equipe assistencial.

Deoxipiridinolina urinária (DPID): Marcador de reabsorção óssea

As amostras de urina foram coletadas após a randomização e por ocasião da alta hospitalar. A coleta era realizada sempre no turno da manhã em virtude da variabilidade no marcador relacionada ao ciclo circadiano. Após coletado, o material era armazenado em freezer com temperatura de -80°C , de acordo com recomendações do fabricante. Na análise, foi empregado o ensaio METRA-DPD-QUIDEL, através do método ELISA. Todas as análises foram realizadas em duplicata. Os resultados foram expressos em nanomols por litro de urina e corrigidos pela creatinina (nmol/mmol).

Variáveis secundárias

As variáveis obtidas antes da randomização incluíram peso de nascimento, comprimento ao nascimento, idade gestacional, idade gestacional corrigida e dados maternos. O peso corporal e os dados referentes ao tipo de leite, volume e calorias ofertadas foram registrados diariamente. O peso corporal foi aferido diariamente, no mesmo horário, com os pacientes despídos, por um funcionário não envolvido na pesquisa. A história clínica e presença de intercorrências foram acompanhadas desde o nascimento até a alta hospitalar. Foram realizadas dosagens semanais de cálcio e fósforo sérico e urinário de todos recém-nascidos. Os níveis de PTH foram dosados no início do estudo e na alta hospitalar.

Todos os exames laboratoriais foram realizados de forma cega por alguém não envolvido diretamente na pesquisa.

Análise estatística

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no programa PEPI (*Programs for Epidemiologists*) versão 4.0 e baseado no estudo de Litmanovitz e colaboradores¹⁷. Para um nível de significância de 5%, um poder de 90%, um desvio padrão para o marcador FAO de 14 U/L e uma diferença de 20 U/L entre os dois grupos, esperando um tamanho de efeito padronizado de 1,43, obteve-se um total mínimo de 12 pacientes em cada grupo. Ao considerar um coeficiente de variação de 1% entre os ensaios e possíveis perdas em 20% a amostra foi aumentada para 15 pacientes por grupo.

Os valores de FAO e DPID foram comparados por Análise de covariância (ANCOVA) e seus resultados expressos em média e desvio padrão. As médias de ganho em DPID e FAO foram ajustadas utilizando como covariantes a diferença observada nas médias iniciais de DPID. O mesmo tratamento foi realizado com referência ao peso inicial. As médias de cálcio e fósforo, bem como níveis séricos de PTH foram comparadas por teste-t. As variáveis não paramétricas foram comparadas por qui-quadrado. Para verificar correlações entre os marcadores bioquímicos e ganho de peso foi utilizado o Teste de Correlação Linear de Pearson. Foram consideradas significativos valores de $p < 0,05$. Os dados foram analisados no programa SPSS Statistics, versão 18.0

Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa da instituição (número 10-0107) e obteve financiamento pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) e FAPERGS. Todos os responsáveis pelos participantes do estudo leram e assinaram o Termo de consentimento informado. Nenhuma coleta de sangue foi realizada exclusivamente para a pesquisa, o volume de amostra adicional ao requerido pela equipe assistencial foi mínimo (100 µL).

Resultados

Foram avaliados 30 prematuros, sendo 15 GC e 15 no GF. A idade gestacional, idade gestacional corrigida no início do estudo, peso de nascimento, gênero e etnia foram similares. Foi feito acompanhamento da oferta diária de nutrientes e também não foram encontradas diferenças significativas na média de calorias, cálcio, proteínas, vitamina D e tipo de leite oferecido entre os recém-nascidos alocados em cada grupo. Ainda, os grupos foram homogêneos em relação ao número de dias em nutrição parenteral total (NPT), dias de Ventilação mecânica e quanto ao uso de antibióticos anterior a alocação. O ganho de peso diário foi significativamente superior no GF ($p \leq 0,001$). Transfusão sanguínea por anemia foi realizada em 4 prematuros do GC e em 6 do GF (Tabela 1).

Não houve diferença significativa em relação à estação do ano no momento do nascimento; no GC sete nasceram na primavera/verão e oito no outono/inverno e, no GF, 5 na primavera/verão e 10 no outono/Inverno ($p=0.71$). Os demais dados maternos e da gestação também foram similares: tabagismo na gestação ocorreu 2 duas gestantes do GC e em 3 do GF. Infecção urinária foi diagnosticada em 5 gestantes, sendo 3 no GC e 2 no GF. Pré-eclâmpsia esteve presente em 13 gestações, 8 no GC e 5 no GF. Corticoesteróide antenatal foi utilizado por 2 gestantes do GC e por 3 no GF. Asma foi relatada como doença crônica em uma gestante do GF e nenhum caso de diabetes gestacional ou prévia à gestação, alcoolismo ou uso de drogas na amostra estudada.

Os níveis de fosfatase alcalina óssea específica (FAO) eram similares entre os dois grupos antes de iniciada a intervenção e, uma vez concluído o protocolo, foram significativamente maiores no GF. Além disso, o GF apresentou elevação nestes níveis muito superior à elevação obtida no GC. (Tabela 2 e Figura 1) Já os níveis de Deoxipiridinolina urinária (DPID) antes da intervenção eram significativamente maiores no GF quando comparados ao do GC e, após a intervenção, os níveis de DPID reduziram no GF e

aumentaram no GC, sendo esta diferença significativa. Ou seja, o GF apresentou redução no valor da DPID até o final do estudo (que representa redução da reabsorção), enquanto o GC obteve aumento do mesmo marcador (que representa aumento da reabsorção ($p < 0,001$)) (Tabela 2 e Figura 2)

No modelo ajustado, considerando as diferenças em DPID inicial e peso inicial, tanto as médias do ganho em FAO como em DPID permaneceram significativas. Os níveis séricos de Ca, P e PTH foram semelhantes entre os grupos antes e após a intervenção. Os resultados das análises bioquímicas estão sumarizados na Tabela 2.

Houve correlação negativa entre o ganho de peso e os níveis de DPID ($r = -0,64$; $p = 0,001$). Não houve correlação significativa entre FAO e ganho de peso.

Discussão

Um protocolo de fisioterapia motora instituído durante a internação neonatal, cinco dias por semana, 15 minutos ao dia, com movimentos de flexão e extensão passivos e compressões articulares suaves demonstrou efeito benéfico na mineralização óssea. Através da análise do marcador FAO, a formação óssea aumentou nos dois grupos estudados, porém, este aumento foi significativo apenas no grupo que recebeu a intervenção. O comportamento da DPID mostrou que a reabsorção aumentou no grupo controle e diminuiu no grupo intervenção, ambos de maneira significativa. O comportamento destes marcadores no decorrer do estudo mostrou, de forma precoce, que o desequilíbrio entre a formação e reabsorção observado inicialmente foi atenuado com a intervenção. A desmineralização excessiva, presente nesta fase da vida pós-natal de RNs prematuros, parece ser desacelerada ou interrompida com esta intervenção fisioterapêutica. Além disso, com mesma oferta diária de nutrientes, o ganho de peso diário foi superior no grupo que recebeu o protocolo de fisioterapia motora passiva.

Verificamos que o ganho de peso apresentou significativa correlação negativa com níveis de DPID. Este achado está de acordo com estudos prévios e sugere que este ganho relaciona-se com maior quantidade de massa magra e massa óssea, não se associando apenas com ganho em gordura corporal, e fortalece a conclusão de que ao ocorrer menor desmineralização óssea, maior será o ganho de peso^{15,19,21}.

Em concordância com nossos resultados, estudos que utilizaram massagens associadas com estímulos táteis e cinestésicos em recém-nascidos, encontraram, em curto prazo, maior ganho de peso e massa óssea^{22,23,24}. Em modelo experimental, os mesmos resultados também foram observados na idade adulta²⁵. Vários pesquisadores sugerem que estas intervenções modulam a resposta do sistema nervoso autônomo a estressores ambientais, minimizando o impacto negativo do estresse pós-natal sobre o crescimento^{22,23,24,25}.

Nemet e colaboradores registraram resultados semelhantes ao nosso estudo. O grupo intervenção apresentou significativa redução dos níveis de ICTP, significativo aumento em FAO, porém o aumento no PICP (outro marcador de formação óssea) não alcançou significância estatística¹⁶. A diferença entre FAO e PICP pode ser explicada, uma vez que a FAO tem sido considerada superior para avaliar formação óssea, ao apresentar menos de 10% de reação cruzada com sua isoforma hepática e não ser influenciada pela filtração glomerular^{26,27}.

Litmanovitz e colaboradores, de forma similar, avaliaram o efeito da estimulação passiva realizada nas primeiras semanas de vida de recém-nascidos prematuros. Encontraram significativa melhora da formação e redução da reabsorção óssea em prematuros que receberam exercícios passivos. No entanto, eles dosaram a reabsorção através do marcador ICTP, e a diferença observada entre os grupos controle e intervenção ao final do estudo não foi significativa¹⁷. O marcador DPID foi escolhido para nosso estudo por não ser absorvido pelo intestino, podendo ser mensurado sem necessidade de restrição alimentar, tornando seu

uso vantajoso em crianças em relação aos demais marcadores de reabsorção. Além disto, sua variabilidade não é afetada pelo elevado *turnover* ósseo, característico desta fase neonatal^{27,28,29}.

Outro aspecto a ser discutido está associado ao tempo de estimulação. Os protocolos das pesquisas citadas reportaram o efeito de 5 a 10 minutos de exercícios passivos ao dia^{15,16,17}. Em estudo prévio, ao aplicarmos o mesmo protocolo de fisioterapia, os efeitos resultantes de 15 minutos ao dia foram superiores aos 5 minutos no ganho de massa óssea, avaliado por DEXA de corpo total¹⁹. Entretanto, a frequência ideal de estimulação passiva é motivo de questionamento^{30,31}.

O crescimento ósseo é influenciado por diversas condições, tais como doenças, uso de medicamentos e pelo tipo de alimentação^{2,32}. Para controlar estes fatores podem ser necessários estudos multicêntricos, a despeito da desvantagem de diferentes práticas alimentares entre os centros. Uma possível limitação de nosso estudo é o pequeno tamanho da amostra, no entanto, o fato de ser um estudo unicêntrico, com critérios de seleção e inclusão rigorosos e randomização garantiu uma amostra homogênea na oferta de nutrientes, minerais e suplementação de vitamina D, dado relevante, já que recentemente foi demonstrado que o ganho de peso e o CMO de prematuros se relacionam com adequado equilíbrio ácido-base, propiciado pela administração de aditivos ao leite materno^{33,34}.

A seleção de nossa amostra foi criteriosa; foram incluídos prematuros sem doenças associadas diretamente com alteração do metabolismo ósseo, sem necessidade de diuréticos e de ventilação mecânica prolongada, sem dificuldades alimentares e, necessariamente, com tamanho adequado para idade gestacional (AIG). Os prematuros pequenos para a idade gestacional possuem maior tendência para desmineralização, especialmente relacionada com o crescimento intrauterino restrito, e no período pós-natal imediato podem apresentar padrão

de crescimento físico ou *catch-up*, mais acelerado, necessário para recuperar a trajetória usual de crescimento^{34,35}.

Aspectos relacionados à sazonalidade foram levados em consideração ao analisar nossos resultados. Diferenças relacionadas à sazonalidade são descritas na literatura como importante causa de déficit de vitamina D e deficiente mineralização óssea. Gestações ocorridas durante o inverno são relacionadas com menor mineralização óssea ao nascimento^{35,36}. Nossos percentuais de prematuros nascidos no inverno e no verão foram semelhantes entre os grupos estudados.

Ainda é desconhecido o mecanismo exato que promove a alteração óssea induzida por exercício em recém-nascidos prematuros. O protocolo de exercícios fisioterapêuticos utilizados nesta pesquisa incluiu amplitude passiva de movimento com suave resistência ao final da flexão e extensão nas articulações. A carga mecânica gerada causa aumento de pressão na articulação e tensão sobre a musculatura, estimulando a mineralização óssea e promovendo uma cascata de eventos celulares, incluindo a elevação dos níveis de Ca intracelulares, maior expressão de fatores de crescimento e aumento da produção de matriz óssea^{1,37}. Segundo Andreoli e colaboradores, a deformação que ocorre nas estruturas envolvidas pode levar a um ótimo nível de formação e a uma inibição da reabsorção que ocorre dentro do ciclo de remodelação óssea normal^{1,13}.

No presente estudo, o aumento nos níveis do marcador FAO e, principalmente, a grande redução do marcador DPID após protocolo de exercícios ao qual nossa amostra foi submetida, demonstram que o desequilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea parece ser atenuado com a intervenção, especialmente através da desaceleração da reabsorção óssea ocorrida no período pós-natal de prematuros. Os benefícios da prevenção e do tratamento da doença metabólica óssea da prematuridade, além de uma alimentação adequada, devem incluir estes exercícios passivos a fim de melhorar o ganho de peso e a qualidade óssea do

premature. Estudos de acompanhamento por maior período são necessários para verificar se o efeito protetor do exercício nesta fase persiste na infância e idade adulta.

Referências

1. Frost H M. From Wolff's law to the Utah paradigm: insights about bone physiology and its clinical applications. *Anat Rec.* 2001;262: 398–419.
2. Kurl S, Heinonen K, Lausimies E. Pre and post-discharge feeding of very preterm infants: impact on growth and bone mineralization. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2003;23:182-9.
3. Chan GM, Armstrong C, Moyer-Mileur L, Hoff C. Growth and bone mineralization in children born prematurely. *J Perinatol.* 2008;28(9):619-23.
4. Petteri H, Anderson S, Jarvenpa AL. Decreased Bone Mineral Density in Adults Born with Very Low Birth Weight: A Cohort Study. *PLOS Med.* 2009;6(8):1-10.
5. Fewtrell MS, Williams J, Singhal A, Murgatroyd PR, Fuller M, Lucas A. Early diet and peak bone mass: 20 year follow-up of a randomized trial of early diet in infants born preterm. *Bone.* 2009;45:142–9.
6. Lingen RA, Simons SHP, Anderson BJ, Tibboel D. The effects of analgesia in vulnerable infant during the perinatal period. *Clin Perinatal.* 2002;29:511-34.
7. Bourrin S, Palle S, Genty C, Alexandre E C. Physical exercise during remobilization restores a normal bone trabecular network after tail suspension-induced osteopenia in young rats. *J Bone Miner Res.* 1995;10:820-8.
8. Miller M.E. The bone disease of preterm birth: a biomechanical perspective. *Pediatr Res.* 2003;53(1):10-5.

9. Vickers A, Ohlsson A, Lacy JB, Horsley A. Massage for promoting growth and development of preterm and/or low birth-weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;2:CD000390.
10. Mackelvie KJ, Petit MA, Khan KM, Beck TJ, McKay MB. Bone mass and structure are enhanced following a 2-year randomized controlled trial of exercise in prepubertal boys. *Bone.* 2004;34:755-65.
11. Larson CM, Henderson RC. Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop.* 2000;20:71-74.
12. McIntyre L, Specker BL, Hudson P. Effect of exercise on bone mineral content in infants 1 to 15 months of age. *Pediatr Res.* 1992; 31:97.
13. Andreoli A, Monteleone M, Van Loan M.; Promenzio L, Tarantino U, De Lorenzo A. Effects of different sports on bone density and muscle mass in highly trained athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33:507-11.
14. Pitukcheewanont P, Punyasavatsut N.; Feuille M. Physical activity and bone health in children and adolescents *Pediatr Endocrinol Rev.* 2010;7:275-82.
15. Moyer-Mileur L, Brunstetter V, McNaught PT, Gill G, Chan GM. Daily physical activity program increases bone mineralization and growth in preterm very low birth weight infants. *Pediatrics.* 2000;106:1088-92.
16. Nemet D, Dolfen T, Litmanowitz I, Shainkin-Kestenbaum R, Lis M, Eliakim A. Evidence for exercise induced bone formation in premature infants. *Int J Sports Med.* 2002;23: 82-5.
17. Litmanovitz I, Dolfen T, Arnons S, Regev RH, Nemet D, Eliakim A. Early physical activity prevents decrease of bone strength on very low birth weight infants. *Pediatrics.* 2003;112: 15-9.

18. Shculzke SM, Trachsel D, Patole SK. Physical activity programs for promoting bone mineralization and growth in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010, Issue 2. Art. No.: CD005387. DOI: 10.1002/14651858.CD005387.pub2.
19. Vignochi CM, Miura E, Canani LH. Effects of motor physical therapy on bone mineralization in premature infants: a randomized controlled study. *J Perinatol.* 2008;28:624-31.
20. Saraiva ALG, Lazaretti-Castro M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. *Arq bras endocrinol metab.* 2002;46:72-8.
21. Eliakin A, Dolfin T, Weiss E, Kestenbaum R, Lis M, Nemet D. The Effects of Exercise on Body Weight and Circulating Leptin in Premature Infants. *J Perinatol.* 2002;22:550-554.
22. Jutapakdeegul N, Casalotti SO, Govitrapong P, Kotchabhakdi N. Postnatal touch stimulation acutely alters corticosterone levels glucocorticoid receptor gene expression in the neonatal rat. *Dev Neurosci.* 2003;25:26-33.
23. Field T, Diego MA, Hernandez-Reif M, Deeds O, Figuereido B. Moderate versus light pressure massage therapy leads to greater weight gain in preterm infants. *Infant Behav Dev.* 2006;29:574-8.
24. Moyer-Mileur LJ, Ball SD, Brunstetter VL, Chan GM. Maternal-administered physical activity enhances bone mineral acquisition. *J Perinatol.* 2008;28:432-7.
25. Chen H, S. Miller, J. Shaw, L. Moyer-Mileur. Massage therapy during early postnatal life promotes greater lean mass and bone growth, mineralization, and strength in juvenile and young adult rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2009;9:278-87.
26. Rauch F, Middelmann I, Cagnoli M. Comparison of total alkaline phosphatase and three assays for bone-specific alkaline phosphatase in childhood and adolescence. *Acta Paediatr.* 1997;86:583-87.

27. Crofton PM, Shrivastava A, Wade JC, Stephen R, Kelnar CJH, Lyon A, McIntosh N. Bone and collagen markers in preterm infants: relationship with growth bone mineral content over the first 10 weeks of life. *Pediatr Res.* 1999;46:581-7
28. Colwell A, Russell RG, Eastell, R. Factors affecting the assay of urinary 3 hydroxypyridinium cross links of collagen as markers of bone resorption. *Eur J Clin Invest.* 1993;23:341-9.
29. Gfatter R, Braun F, Herkner K, Kohlross C, Hackl P. Urinary excretion of pyridinium crosslinks and N-terminal crosslinked peptide in preterm and term infants. *Int J Clin Lab Res.* 1997;27:238-243.
30. Umemura Y, Ishiko T, Yamauchi T. Five jumps per day increase bone mass and breaking force in rats. *J Bone Miner Res.* 1997;12:1480-5.
31. Robling AG, Burr DB, Turner CH. Recovery periods restore mechanosensitivity to dynamically loaded bone. *J Exp Biol.* 2001;204:3389-99.
32. Mora S, Weber G, Belini C, Chiumello G. Bone modeling alteration in preterm infants. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1994;148:1017-21.
33. Namgung R, Tsang RC, Specker BL, Sierra RI, Ho ML. Reduced serum osteocalcin and 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations and low bone mineral content in small for gestational age infants: Evidence of decreased bone formation rates. *J Pediatr* 1993;122:269-275.
34. Albertsson-Wikland K, Karlberg J. Natural growth in children born small for gestational age with and without catch-up growth. *Acta Paediatr.* 1994; 399:64-70.
35. Namgung R, Tsang RC, Lee C, Han DG, Ho ML, Sierra RI. Low total body bone mineral content and high bone resorption in Korean winter-born versus summer-born newborn infants. *J Pediatr.* 1999;134:125-36

36. Bassir M, Laborie S, Lapillonne A, Claris O, Chappuis MC, Salle BL. Vitamin D deficiency in Iranian mothers and their neonates: a pilot study. *Acta Paediatr.* 2001;90:577-9.
37. Turner CH. Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. *Bone.* 1998;23:399-407.

Tabela 1: Caracterização da amostra

Variáveis	Grupo						P
	Controle (n=15)			Intervenção (n=15)			
Idade gestacional (semanas)	30,73	±	1,53	30,87	±	1,41	0,806
Peso de nascimento (g)	1350,67	±	221,12	1326,33	±	250,17	0,780
Peso Inicial (g)	1472	±	94,18	1373	±	93,84	0,007
Peso final (g)	2034	±	56	2037	±	36,73	0,864
Ganho de peso por dia (g)	20,96	±	4,24	27,43	±	3,73	≤0,001
IG corrigida após a randomização	33,76	±	0,63	33,84	±	0,62	0,707
Número de dias em tratamento	25,87	±	3,14	24,73	±	2,18	0,261
Número de dias em ventilação mecânica	3,13	±	3,87	4,53	±	5,25	0,413
Número de dias com NPT	4,73	±	4,79	6,60	±	6,52	0,379
Energia (calorias/kg/dia)	121,01	±	3,07	118,87	±	3,02	0,07
Oferta de Proteína (g/kg/dia)	3,23	±	0,17	3,22	±	0,17	0,765
Oferta de Cálcio (mg/kg/dia)	164,25	±	6,12	162,09	±	5,24	0,310
Oferta de Fósforo (mg/kg/dia)	85,53	±	1,59	45,40	±	1,35	0,807
Oferta de Vitamina D (UI /dia)	309,96	±	10	310,66	±	10,33	0,852
Alimentação **							
- Leite materno fortificado			3			2	0,426
- Fórmula nutricional			2			5	
- Misto			10			8	
Gênero **							
- Feminino			8			9	0,864
- Masculino			7			6	
Etnia **							
- Negra			1			2	0,825
- Branca			14			13	
Uso de antibióticos antes da randomização**			8			10	0,710
Transfusão sanguínea antes da randomização**			4			6	0,700

**Variáveis analisadas pelo teste Qui-quadrado e representadas por número de indivíduos. Demais variáveis foram analisadas por Teste-t e representadas através de média e desvio padrão.

Tabela 2: Avaliação bioquímica do metabolismo ósseo previa e após protocolo de fisioterapia em prematuros

Variáveis	Grupo		P
	Grupo Controle (15)	Grupo Fisioterapia 15	
DPID (nmol/mmol)			
Inicial	64,13 ± 33,87	104,93 ± 45,77	0,01
Final	131,40 ± 42,79	59,40 ± 31,94	≤0,001
Ganho ou Diferença	67,27 ± 50,99	- 45,53 ± 43,80	≤0,001
Ganho* (média ajustada para DPID Inicial e Peso inicial)	49,94 ± 11,05	-28,21 ± 11,05	≤0,001
FAO			
Inicial	108,28 ± 12,86	104,98 ± 19,40	0,588
Final	112,27 ± 13,18	126,31 ± 16,72	0,02
Ganho ou diferença	3,98 ± 13,92	21,33 ± 14,72	0,003
Ganho* (média ajustada para peso inicial)	2,87 ± 3,99	22,44 ± 3,99	0,003
CALCIO sérico (mg/dl)			
Inicial	8,92 ± 0,64	8,95 ± 0,58	0,883
Final	8,93 ± 0,42	8,74 ± 0,53	0,277
FÓSFORO sérico (mg/dl)			
Inicial	6,77 ± 0,89	6,86 ± 0,58	0,737
Final	6,93 ± 0,66	6,87 ± 0,56	0,982
PTH (pg/ml)	N=14	N=15	
Inicial	25,53 ± 3,52	24,24 ± 2,79	0,280
Final	24,77 ± 4,03	24,91 ± 2,56	0,920

*Médias ajustadas por ANCOVA. Demais médias comparadas através de Teste-t. Resultados expressos através de média e desvio padrão.

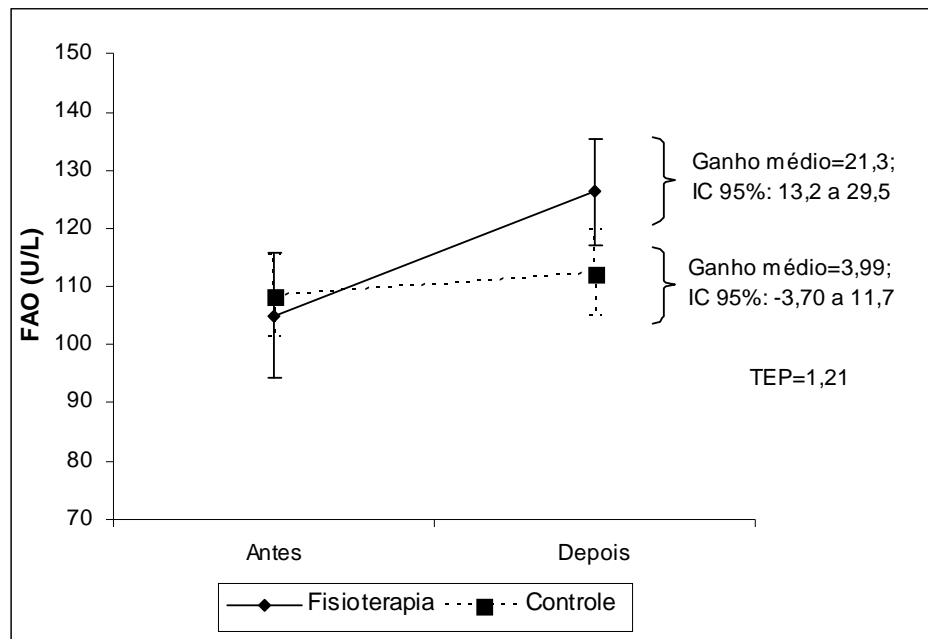


Figura 1: Comparação entre as médias do ganho em FAO no início e final do estudo.

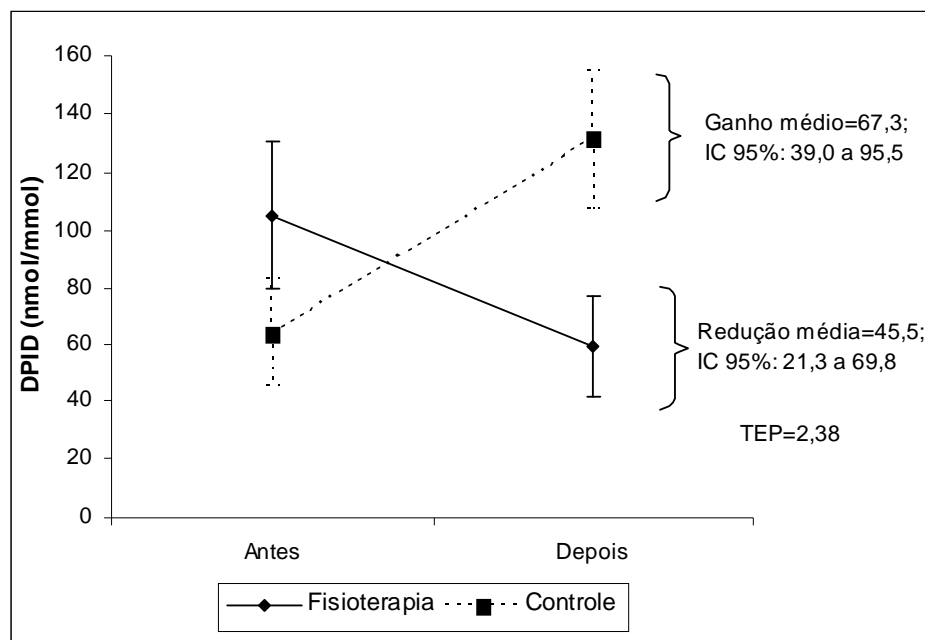


Figura 2: Comparação entre as médias de ganho em DPID no início e final do estudo.

ARTIGO – VERSÃO EM INGLÊS**MOTOR PHYSICAL THERAPY REDUCES BONE RESORPTION AND
INCREASES BONE MINERALIZATION IN PRETERM INFANTS****ABSTRACT**

Introduction: Preterm infants need minimal handling in order to protect them from stress, resulting in bone resorption and demineralization. **Objectives:** To evaluate bone formation in newborn preterm infants before and after a physical therapy protocol, by means of biochemical markers bone-specific alkaline phosphatase (BAP) and urinary deoxypyridinoline (DPD). **Method:** Randomized controlled clinical trials included 30 newborn preterm infants with gestational ages of 35 weeks or less and appropriate weight for gestational age were randomized into control group (CG) and physiotherapy group (PG). Physical therapy protocol consisted of 15 minutes of daily passive movements with gentle joint compression, five days a week. Daily data were obtained on feeding and body weight. BAP and DPD were collected before and after intervention in both groups. ANCOVA test was performed to compare the means of both groups. **Results:** At baseline, gestational age and corrected gestational age, birth weight and gender were similar between groups. The supply of nutrients, time of use of Total Parenteral Nutrition and mechanical ventilation were similar among groups. The increase of BAP levels for PG was 22.44 ± 3.49 U/L, whereas CG presented an increase of 2.87 ± 3.99 U/L ($p= 0.003$). There was a reduction on DPD levels for PG of 28.21 ± 11.05 nmol/mmol, and an increase of 49.95 ± 11.05 nmol/mmol ($p < 0.001$) in GC. **Conclusion:** Physiotherapy intervention results in beneficial effects to bone metabolism of preterm infants and should be included in the standard care of preterm infants.

Keywords: Preterm . Bone markers. Physiotherapy. Osteopenia.

Introduction

Mineral supply and calciotropic hormones plus fetal movements against the uterine wall are essential for intrauterine bone development^{1,2}. Postnatal nutrition of preterm infant does not match the intrauterine supply². As a result there is increased bone fragility, susceptibility to fractures and growth disorders. It was observed that these changes may persist throughout childhood and adulthood^{3,4,5}. Standard care of preterm infants consists, in general, in restriction of physical and sensory stimulation as a way to maintain stability and reduce postnatal stress⁶. The result of this inactivity and the difficulty of supplying minerals collaborate to the inadequate stimulation of bone metabolism^{7,8,9,10}.

There is evidence that mechanical forces stimulate bone formation and growth, while inactivity predisposes to reabsorption^{7,11}. Exercises have been used as part of treatment and prevention of osteopenia in different stages of life, by inducing osteoblasts to increase their activity in response to mechanical overload^{9,12,13,14}.

In recent years, some authors suggested that 5 minutes of daily passive stimulation results in increased bone mineral density (BMD) in preterm newborns^{15,16,17}. However, current evidence does not support its routine use. Different methods of assessing bone mineralization and methodological constraints have limited these results¹⁸.

Our group previously evaluated by means of whole body dual X-ray absorptiometry (DEXA) the effect of passive stimulation performed for 15 minutes a day. The results showed increased bone mineral content (BMC), but no biochemical markers were measured¹⁹. By measuring BMC and BMD, we can only see if there is less bone quantity produced. Biochemical analysis had demonstrated if there was a failure in mineralization due to poor of formation, or if there was exaggerated reabsorption²⁰.

Our objective was to evaluate bone formation in newborn preterm infants before and after a physical therapy protocol, by means of biochemical markers bone-specific alkaline phosphatase (BAP) and urinary deoxypyridinoline (DPD).

Material and Methods

Randomized controlled trial conducted in the Neonatal Intensive Care Unit of Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA), including preterm infants with gestational ages of 35 weeks or less, appropriate for gestational age (AGA), hemodynamically stable and able to receive sufficient enteral feeding to provide an average caloric supply of 110 ml/kg/day. We excluded those infants requiring mechanical ventilation or oxygen therapy at randomization, grades 3 and 4 periventricular hemorrhage, bronchopulmonary dysplasia, neurological diseases, congenital malformations and genetic syndromes and who were using diuretics or corticosteroids.

Patients' enteral nutrition consisted of supplemented breast milk or infant formula when it was not possible to offer breast milk.

Randomization

We generated a sequence of random numbers, and a person not involved in the research conducted the group allocation. Patients who met the inclusion criteria when they were tolerating enteral feeding of 110 kcal/kg/day were randomized to control group (CG) or physiotherapy group (PG). Both groups received the same routine care, as well as maternal care or cuddling. Besides of such care, PG received the protocol described below.

Physiotherapy Exercise Protocol

The same researcher performed daily physical therapy intervention, five days a week, 15 minutes a day, which was performed at least 30 minutes after the patient receives nutrition and was interrupted at the time the infant reached 2000 g (hospital discharge). Passive flexion and extension movements with soft articular compressions at the end of each movement were the exercises performed. We performed 10 reps on the wrists, elbows, shoulders, ankles, knees and hips, right and left lateral position.

Main variables

Bone specific alkaline phosphatase (BAP): Marker of Bone Formation

Blood samples were collected before intervention and at discharge, always in the morning, and then stored in a freezer at - 80° C at the research center of HCPA. For the analysis the test METRA BAP-Quidel, using ELISA, was performed. All samples were measured in duplicate, and the mean value of the tests was used. The results were expressed as U/L. No blood sample was obtained solely for research. We collected an additional volume as required by the care team.

Urinary deoxypyridinoline (DPD): Bone resorption marker

DPD urine samples were collected before intervention and at discharge. The collection was always performed in the morning due to marker variability related to the circadian cycle. After they were stored in a freezer at -80° C according to the manufacturer's recommendations. In the analysis we employed the METRA DPD-Quidel test, using ELISA. All tests were performed in duplicate. Results were expressed as nanomoles per liter of urine and corrected for creatinine (nmol/mmol).

Secondary variables

The variables collected before randomization included birth weight, birth length, gestational age, corrected gestational age and maternal data. Gestational age was evaluated by maternal dates and confirmed by early obstetrical ultrasound and neonatal clinical examination. Body weight and type of milk, milk volume and calories offered were recorded daily. Body weight was measured daily at the same time, with patients naked, by an employee not involved in the research. Clinical history and presence of complications were followed from birth until hospital discharge. We performed weekly dosing of calcium and serum phosphorus and urine of all newborns. Parathyroid hormone (PTH) levels were measured at baseline and at discharge. All laboratory blind analysis was performed by someone not directly involved in the research.

Statistical analysis

The sample size calculation was performed with the program PEPI (Programs for Epidemiologists) version 4.0 and based on previous studies¹⁷. For a significance level of 5%, 90% power, standard deviation for the marker BAP of 14 U/L and a difference of 20 U/L between the two groups, waiting for a standardized effect size of 1.43, we obtained a minimum total of 12 patients in each group. When considering a coefficient of variation of 1% between the tests and possible losses of 20% the sample was increased to 15 patients per group.

BAP and DPD values were compared by analysis of covariance (ANCOVA) and the results are expressed as means \pm standard deviation (SD). BAP and DPD mean gains were adjusted using the observed difference in mean initial DPD as covariates. The same treatment was carried out for the initial weight. Mean calcium and phosphorus and serum PTH levels were analyzed by t-test. Chi-square test was applied in associations. In the Correlations

between biochemical markers and body weight gain we used Pearson's Linear Correlation Test. A significance level was established at $p < 0.05$. The data were analyzed using Statistical Package for Social Sciences software (SPSS 18.0).

Ethical considerations

The study was approved by the Ethics Research Committee (number 10-0107). All those responsible for the study participants read and signed an informed consent. No blood samples were done exclusively for the study; the additional sample volume required by the medical care team was minimal (100 μ L).

Results

We studied 30 infants: 15 in the CG and 15 in the PG. The gestational age, corrected gestational age at study, birth weight, gender and ethnicity were similar. We followed the daily supply of nutrients and there were no significant differences in mean calories, calcium, protein, vitamin D and type of milk offered among newborns allocated to each group. Again, the groups were homogeneous with respect to number of days on total parenteral nutrition (TPN), days of mechanical ventilation and antibiotics before being allocated. The daily weight gain was significantly higher in PG ($p \leq 0.001$). Blood transfusion for anemia was held on 4 preterm infants of the CG and 6 of the PG (Table 1).

There was no significant difference in relation to the season of birth: seven infants of the CG were born in the spring/summer and eight in the fall/winter; and five infants of PG were born in the spring/summer and 10 in the autumn/winter ($p = 0.71$). Other maternal and pregnancy data were also similar: two mothers of the CG and three of the PG were smokers. Urinary tract infection was diagnosed in five women: three of CG and two of PG. Pre-eclampsia was present in 13 pregnancies: eight on CG and five in PG. Antenatal

corticosteroids were used by two women in the CG and three in the PG. Asthma was reported as chronic illness in one mother of PG. There were no cases of gestational diabetes or prior to pregnancy, alcoholism or drug use in the study sample.

BAP was similar between CG and PG before the intervention and significantly higher in the PG after the intervention. In addition, PG showed an increase in these levels much higher than the increase obtained in CG (Table 2 and Figure 1). The levels of DPD before the intervention were significantly higher in the PG compared to the CG, and after the intervention levels of DPD decreased in PG and increased in the CG, with a significant difference. That is, the PG presented decreased value of DPD until the end of the study (which represents a reduction in bone resorption), while CG had an increase of the same marker (representing increased bone resorption ($p \leq 0.001$)) (Table 2 and Figure 2).

In the adjusted model, considering the differences in initial DPD and initial weight, both the average gain in BAP and DPD remained significant. Calcium, phosphorus and PTH serum levels were similar in both groups before and after intervention. The results of biochemical analysis are summarized in Table 2.

There was a negative correlation between weight gain and DPD levels ($r = -0.64$, $p = 0.001$). There was no significant correlation between BAP and weight gain.

Discussion

A motor physiotherapy protocol instituted during neonatal hospitalization, five days a week, 15 minutes a day, with passive flexion and extension movements and gentle joint compressions has shown beneficial effects on bone mineralization. Bone formation measured by BAP increased in both groups, but this increase was significant only in the group receiving the intervention. Resorption measured by DPD increased significantly in the control group and decreased significantly in the intervention group. The behavior of these markers during

the study showed that the imbalance between formation and resorption initially presented was mitigated by the intervention. The excessive demineralization, present at this stage of postnatal life in preterm neonates appears to be slowed or halted with physiotherapy intervention. Moreover, with the same daily supply of nutrients, the daily weight gain was higher in the group receiving passive physical therapy protocol.

In our study the weight gain showed a significant negative correlation with DPD levels in agreement with previous publications where lower bone demineralization is followed by higher weight gain^{15,19,21}. Massage associated with kinesthetic and tactile stimuli in newborns results in greater weight and bone mass gain^{22,23,24}. Many researchers suggest that these interventions modulate the autonomic nervous system response to environmental stressors, minimizing the negative impact of postnatal stress on the growth^{22,23,24,25}.

Nemet et al. found similar results to our study. The intervention group had a significant reduction in C-terminal cross-links telopeptide of type-I collagen (ICTP) levels, a significant increase in BAP, but C-terminal procollagen peptide (PICP) increase (another marker of bone formation) did not reach statistical significance¹⁶. BAP has been considered superior to assess bone formation, while presenting less than 10% of its cross-reactivity with liver isoform and is not influenced by glomerular filtration^{26,27}.

Litmanovitz et al assessed the effect of passive stimulation within the first week of life in preterm infants. They found significant improvement in the formation and reduction of bone resorption in preterm infants who received passive exercises. They measured the resorption by ICTP and the difference between the control and intervention groups was not significant¹⁷. We chose DPD because it is not absorbed by the intestine, can be measured without food restriction, making its use advantageous in children in relation to other markers of resorption, and its variability is not affected by high bone turnover, characteristic of the neonatal phase^{27,28,29}.

The ideal frequency of passive stimulation is questionable^{30,31}. The protocols of different studies have varied from 5 to 10 minutes of daily passive exercises^{15,16,17}. In a previous study we determined that the effect of 15 minutes per day was greater than 5 minutes in the gain of bone mass, measured by whole body DEXA¹⁹.

Bone growth is influenced by many conditions, such as diseases, medications and feeding^{2,32}. A possible limitation of our study is the small sample size; however, we had a strict selection criteria and blinded randomization ensured a homogeneous sample in the supply of nutrients, minerals and vitamin D supplementation. Our sample selection was careful: we included preterm infants AGA, with no diseases directly associated with abnormal bone metabolism, no need for diuretics and/or prolonged mechanical ventilation, and no feeding difficulties. Small for gestational age have a greater tendency for demineralization, especially related to restricted intrauterine growth. Also, in the immediate postnatal period, they may present a faster pattern of physical growth or catch-up (needed to recover the usual growth trajectory), then we did not include them in our study^{33,34}.

The seasons of the year were taken into account in the results of the study. Differences related to seasonality have been studied as an important cause of Vitamin D deficiency and impaired bone mineralization. Pregnancies and delivers during the winter are related to lower bone mineralization at birth^{35,36}. In our study, the preterm infants born in winter and summer were similar between groups.

The exact mechanism that promotes bone changes induced by exercise in premature newborns remains unclear. The protocol of physiotherapy exercise used in this study included passive movements with mild resistance at the end of flexion and extension of the joints. The generated mechanical load causes increased joint pressure and stress on the muscles, stimulating bone mineralization and promoting a cascade of cellular events, including elevation of intracellular calcium levels, increased expression of growth factors and increased

production of bone matrix^{1,37}. According Andreoli et al the deformation that occurs in the structures involved can lead to an optimum formation level and an inhibition of resorption that occurs within the normal cycle of bone remodeling¹³.

In this study, increased levels of the marker BAP and especially the large reduction of marker DPD after exercise protocol to which our sample was submitted shows that the imbalance between bone formation and resorption seems to be mitigated by the intervention, especially by slowing bone resorption occurred in the postnatal period for preterm infants. Longer follow-up studies are needed to verify whether the protective effect of exercise at this stage persists in childhood and adulthood.

References

1. Frost HM. From Wolff's law to the Utah paradigm: insights about bone physiology and its clinical applications. *Anat Rec.* 2001; 262:398-419.
2. Kurl S, Heinonen K, Lausimies E. Pre and post-discharge feeding of very preterm infants: impact on growth and bone mineralization. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2003;23:182-9.
3. Chan GM, Armstrong C, Moyer-Mileur L, Hoff C. Growth and bone mineralization in children born prematurely. *J Perinatol.* 2008;8(9):619-23.
4. Petteri H, Anderson S, Jarvenpa AL. Decreased Bone Mineral Density in Adults Born with Very Low Birth Weight: A Cohort Study. *PLOS Med.* 2009;6(8):1-10.
5. Fewtrell MS, Williams J, Singhal A, Murgatroyd PR, Fuller M, Lucas A. Early diet and peak bone mass: 20 year follow-up of a randomized trial of early diet in infants born preterm. *Bone.* 2009;45:142-9.
6. Lingen RA, Simons SHP, Anderson BJ, Tibboel D. The effects of analgesia in vulnerable infant during the perinatal period. *Clin Perinatal.* 2002;29:511-34.

7. Bourrin S, Palle S, Genty C, Alexandre E C. Physical exercise during remobilization restores a normal bone trabecular network after tail suspension-induced osteopenia in young rats. *J Bone Miner Res.* 1995;10:820-8.
8. Miller M.E. The bone disease of preterm birth: a biomechanical perspective. *Pediatr Res.* 2003;53(1):10-5.
9. Vickers A, Ohlsson A, Lacy JB, Horsley A. Massage for promoting growth and development of preterm and/or low birth-weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;2:CD000390.
10. Mackelvie KJ, Petit MA, Khan KM, Beck TJ, McKay H. Bone mass and structure are enhanced following a 2-year randomized controlled trial of exercise in prepubertal boys. *Bone* 2004;34:755-65.
11. Larson CM, Henderson RC. Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop.* 2000;20:71-74.
12. McIntyre L, Specker BL, Hudson P. Effect of exercise on bone mineral content in infants 1 to 15 months of age. *Pediatr Res.* 1992;31:97.
13. Andreoli A, Monteleone M, Van Loan M.; Promenzio L, Tarantino U, De Lorenzo A. Effects of different sports on bone density and muscle mass in highly trained athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33:507-11.
14. Pitukcheewanont P, Punyasavatsut N.; Feuille M. Physical activity and bone health in children and adolescents. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2010;7:275-82.
15. Moyer-Mileur L, Brunstetter V, Mcnaught PT, Gill G, Chan GM. Daily physical activity program increases bone mineralization and growth in preterm very low birth weight infants. *Pediatrics.* 2000;106:1088-92.
16. Nemet D, Dolfen T, Litmanowitz I, Shainkin-Kestenbaum R, Lis M, Eliakim A. Evidence for exercise induced bone formation in premature infants. *Int J Sports Med.* 2002;23:82-5.

17. Litmanovitz I, Dolfín T, Arnons S, Regev RH, Nemet D, Eliakin A. Early physical activity prevents decrease of bone strength on very low birth weight infants. *Pediatrics*. 2003;112:15-9.
18. Shculzke SM, Trachsel D, Patole SK. Physical activity programs for promoting bone mineralization and growth in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010, Issue 2. Art. No.: CD005387. DOI: 10.1002/14651858.CD005387.pub2.
19. Vignochi CM, Miura E, Canani LH. Effects of motor physical therapy on bone mineralization in premature infants: a randomized controlled study. *J Perinatol*. 2008;28:624-31.
20. Saraiva ALG, Lazaretti-Castro M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. *Arq bras endocrinol metab*. 2002;46:72-8.
21. Eliakin A, Dolfín T, Weiss E, Kestenbaum R, Lis M, Nemet D. The Effects of Exercise on Body Weight and Circulating Leptin in Premature Infants. *J Perinatol*. 2002; 22:550-554.
22. Jutapakdeegul N, Casalotti SO, Govitrapong P, Kotchabhakdi N. Postnatal touch stimulation acutely alters corticosterone levels glucocorticoid receptor gene expression in the neonatal rat. *Dev Neurosci*. 2003;25:26-33.
23. Field T, Diego MA, Hernandez-Reif M, Deeds O, Figuereido B. Moderate versus light pressure massage therapy leads to greater weight gain in preterm infants. *Infant Behav Dev*. 2006;29:574-8.
24. Moyer-Mileur LJ, Ball SD, Brunstetter VL, Chan GM. Maternal-administered physical activity enhances bone mineral acquisition. *J Perinatol*. 2008;28:432-7.
25. Chen H, S. Miller, J. Shaw, L. Moyer-Mileur. Massage therapy during early postnatal life promotes greater lean mass and bone growth, mineralization, and strength in juvenile and young adult rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2009;9:278-87.

26. Rauch F, Middelmann I, Cagnoli M. Comparison of total alkaline phosphatase and three assays for bone-specific alkaline phosphatase in childhood and adolescence. *Acta Paediatr.* 1997;86:583-7.
27. Crofton PM, Shrivastava A, Wade JC, Stephen R, Kelnar CJH, Lyon A, McIntosh N. Bone and collagen markers in preterm infants: relationship with growth bone mineral content over the first 10 weeks of life. *Pediatr Res.* 1999;46:581-7.
28. Colwell A, Russell RG, Eastell, R. Factors affecting the assay of urinary 3 hydroxypyridinium cross links of collagen as markers of bone resorption. *Eur J Clin Invest.* 1993;23:341-9.
29. Gfatter R, Braun F, Herkner K, Kohlross C, Hackl P. Urinary excretion of pyridinium crosslinks and N-terminal crosslinked peptide in preterm and term infants. *Int J Clin Lab Res.* 1997;27:238-243.
30. Umemura Y, Ishiko T, Yamauchi T, et al. Five jumps per day increase bone mass and breaking force in rats. *J Bone Miner Res.* 1997;12:1480-5.
31. Robling AG, Burr DB, Turner CH. Recovery periods restore mechanosensitivity to dynamically loaded bone. *J Exp Biol.* 2001;204:3389-99.
32. Mora S, Weber G, Belini C, Chiumello G. Bone modeling alteration in preterm infants. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1994;148:1017-21.
33. Namgung R, Tsang RC, Specker BL, Sierra RI, Ho ML. Reduced serum osteocalcin and 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations and low bone mineral content in small for gestational age infants: Evidence of decreased bone formation rates. *J Pediatr.* 1993;122:269-275.
34. Albertsson-Wikland K, Karlberg J. Natural growth in children born small for gestational age with and without catch-up growth. *Acta Paediatr.* 1994;399:64-70.

35. Namgung R, Tsang RC, Lee C, Han DG, Ho ML, Sierra RI. Low total body bone mineral content and high bone resorption in Korean winter-born versus summer-born newborn infants. *J Pediatr.* 1999;134:125–6.36.
36. Bassir M, Laborie S, Lapillonne A, Claris O, Chappuis MC, Salle BL. Vitamin D deficiency in Iranian mothers and their neonates: a pilot study. *Acta Paediatr.* 2001;90:577–9.
37. Turner CH. Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. *Bone.* 1998;23:399-407.

Table 1 – Sample Characterization

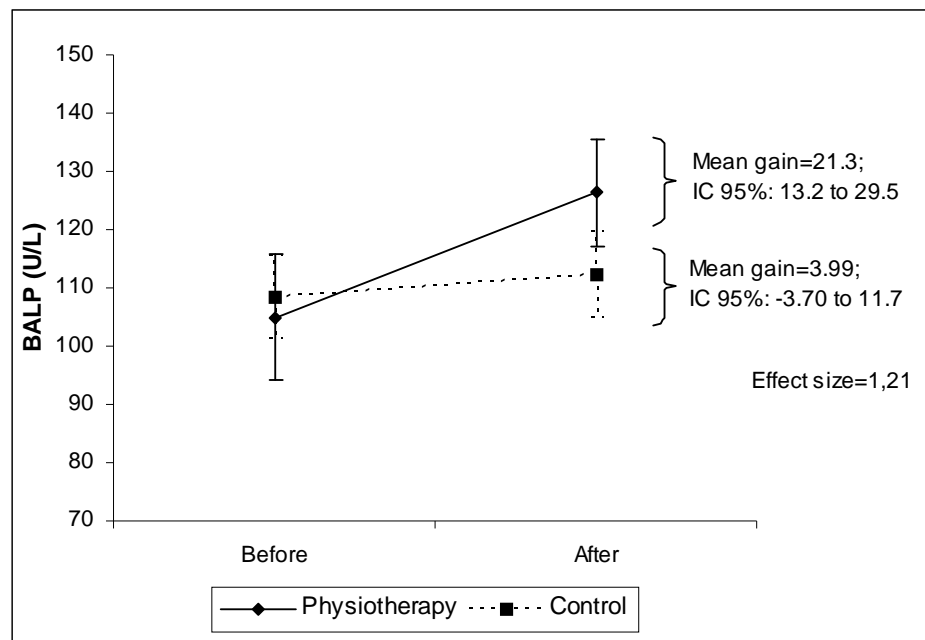
Variables	Group					P
	Control (n=15)		Intervention (n=15)			
Gestational age (weeks)	30.73	± 1.53	30.87	± 1.41		0.806
Birth weight (g)	1350.67	± 221.12	1326.33	± 250.17		0.780
Initial weight (g)	1472	± 94.18	1373	± 93.84		0.007
Final weight (g)	2034	± 56	2037	± 36.73		0.864
Weight gain per day (g)	20.96	± 4.24	27.43	± 3.73		<0.001
Corrected gestational age after randomization	33.76	± 0.63	33.84	± 0.62		0.707
Number of days in treatment	25.87	± 3.14	24.73	± 2.18		0.261
Number of days in mechanical ventilation	3.13	± 3.87	4.53	± 5.25		0.413
Number of days with TPN	4.73	± 4.79	6.60	± 6.52		0.379
Energy (calories/kg/day)	121.01	± 3.07	118.87	± 3.02		0.07
Protein supply (g/kg/day)	3.23	± 0.17	3.22	± 0.17		0.765
Calcium supply (mg/kg/day)	164.25	± 6.12	162.09	± 5.24		0.310
Phosphorus supply (mg/kg/day)	85.53	± 1.59	45.40	± 1.35		0.807
Vitamin D supply (UI/day)	309.96	± 10	310.66	± 10.33		0.852
Food **						
- Fortified breast milk	3		2			0.426
- Nutritional Formula	2		5			
- Mixture	10		8			
Gender **						
- Female	8		9			0.864
- Male	7		6			
Ethnicity **						
- Black	1		2			0.825
- White	14		13			
Use of antibiotics **	8		10			0.710
Blood transfusion **	4		6			0.700

**Variables analyzed by chi-square and represented by the number of individuals. Other variables were analyzed by t-test and represented as mean and standard deviation.

Table 2: Biochemical assessment of bone metabolism prior and after physiotherapy protocol in premature infants

Variables	Group		P
	Control (15)	Physiotherapy (15)	
DPD (nmol/mmol)			
Initial	64.13 ± 33.87	104.93 ± 45.77	0.01
Final	131.40 ± 42.79	59.40 ± 31.94	<0.001
Gain or Difference	67.27 ± 50.99	- 45.53 ± 43.80	<0.001
Gain * (means adjusted for Initial DPD and initial weight)	49.94 ± 11.05	-28.21 ± 11.05	<0.001
BAP (U/L)			
Initial	108.28 ± 12.86	104.98 ± 19.40	0.588
Final	112.27 ± 13.18	126.31 ± 16.72	0.02
Gain or difference	3.98 ± 13.92	21.33 ± 14.72	0.003
Gain* (mean adjusted for initial weight)	2.87 ± 3.99	22.44 ± 3.99	0.003
Serum Calcium (mg/dl)			
Initial	8.92 ± 0.64	8.95 ± 0.58	0.883
Final	8.93 ± 0.42	8.74 ± 0.53	0.277
Serum Phosphorus (mg/dl)			
Initial	6.77 ± 0.89	6.86 ± 0.58	0.737
Final	6.93 ± 0.66	6.87 ± 0.56	0.982
PTH (pg/ml)	N=14	N=15	
Initial	25.53 ± 3.52	24.24 ± 2.79	0.280
Final	24.77 ± 4.03	24.91 ± 2.56	0.920

*Means adjusted by ANCOVA. Other means were compared by t-test. Results are expressed as mean and standard deviation.

**Figure 1:** Comparison between the mean gain in BAP in the beginning and end of the study.

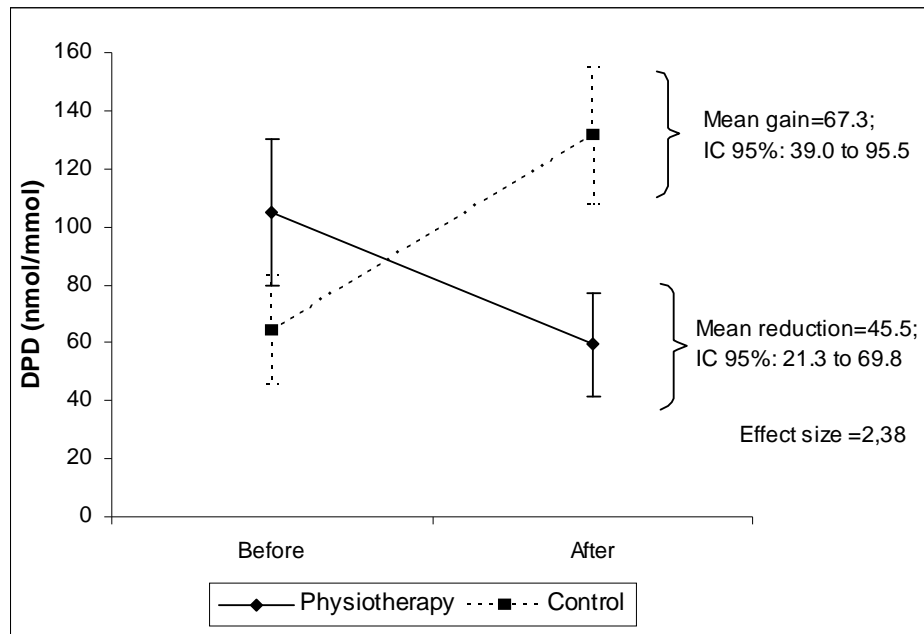


Figure 2: Comparison between the mean gains in DPD in the beginning and end of the study.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados nesta pesquisa permitiram a conclusão de que através de uma intervenção fisioterapêutica precoce, realizada no período de internação neonatal, é possível melhorar a mineralização óssea de RNs prematuros, enquanto a limitação destes movimentos predispõe ao aumento da desmineralização. Através da medida de marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo foi possível avaliar de forma conjunta os processos de formação e reabsorção óssea. Verificamos que no grupo intervenção a reabsorção óssea analisada pelo marcador DPID foi significativamente reduzida, enquanto a formação óssea analisada pelo marcador FAO elevou-se. Além disso, com mesma oferta diária de nutrientes, o ganho de peso ao dia foi superior no grupo que recebeu o protocolo de fisioterapia motora passiva. Foi possível estabelecer correlação negativa entre o ganho de peso e o marcador DPID, fato que fortalece a conclusão de que, ao ocorrer menor desmineralização óssea, maior será o ganho de peso destes pacientes.

Nossos resultados contribuem na constatação de que os RNs prematuros não devem ser privados desta forma de estimulação motora, uma vez que, associada com adequada oferta nutricional, contribui para a adequada estimulação do metabolismo ósseo destes pacientes.