



Universidad Miguel Hernández de Elche

Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

**Influencia de la actividad física y las conductas
sedentarias en la longitud del telómero en la
infancia: Proyecto TeloDiPA**

TESIS DOCTORAL

Daniel Prieto Botella

DIRECTORA

Eva María Navarrete Muñoz

CODIRECTORA

Desirée Valera Gran

Alicante, 2023

La presente tesis doctoral titulada “*Influencia de la actividad física y las conductas sedentarias en la longitud del telómero en la infancia: Proyecto TeloDiPA*” se presenta bajo la modalidad de tesis por compendio de las siguientes publicaciones:

Prieto-Botella D, Martens DS, Valera-Gran D, Subiza-Pérez M, Tardón A, Lozano M, Casas M, Bustamante M, Jimeno-Romero A, Fernández-Somoano A, Llop S, Vrijheid M, Nawrot TS, Navarrete-Muñoz EM. [Sedentary Behaviour and Telomere Length Shortening during Early Childhood: Evidence from the Multicentre Prospective INMA Cohort Study](#). *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2023; 20: 5134. doi:10.3390/ijerph20065134

Prieto-Botella D, Valera-Gran D, Santa-Marina L, Babarro I, Subiza-Pérez M, Casas M, Guxens M, Cárdenas-Fuentes G, Heude B, Bernard JY, Rosemary RCM, García-Aymerich J, Vrijheid M, Navarrete-Muñoz EM. [Validation of a Parent-Reported Physical Activity Questionnaire by Accelerometry in European Children Aged from 6 to 12 Years Old](#). *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2022; 19: 9178. doi:10.3390/ijerph19159178



La Dra. Dña. *Eva María Navarrete Muñoz*, y la Dra. Dña. *Desirée Valera Gran*, directora y codirectora de la tesis doctoral titulada “*Influencia de la actividad física y las conductas sedentarias en la longitud del telómero en la infancia: Proyecto TeloDiPA*”, profesoras Ayudante Doctora y Contratada Doctora de la Universidad Miguel Hernández de Elche

INFORMAN:

Que D. *Daniel Prieto Botella* ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado “*Influencia de la actividad física y las conductas sedentarias en la longitud del telómero en la infancia: Proyecto TeloDiPA*” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en San Juan de Alicante a de de 2023

Directora de la tesis

Dra. Dña. *Eva María Navarrete Muñoz*

Codirectora de la tesis

Dra. Dña. *Desirée Valera Gran*



La Dra. Dña. *María del Mar Masiá Canuto*, Coordinadora del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas de la Universidad Miguel Hernández de Elche


INFORMA:

Que D. *Daniel Prieto Botella* ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado “*Influencia de la actividad física y las conductas sedentarias en la longitud del telómero en la infancia: Proyecto TeloDiPA*” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en San Juan de Alicante a de de 2023

Prof. Dra. Dña. *María del Mar Masiá Canuto*

Coordinador/a del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas de la Universidad Miguel Hernández de Elche



Poco a poco, uno viaja lejos.

J. R. R. Tolkien

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Los telómeros	1
1.1. Origen, biología y estructura	1
1.2. Métodos de medición.....	2
1.3. Telómeros y salud.....	6
1.4. Factores ambientales y acortamiento de los telómeros	7
2. Actividad física	9
2.1. Actividad física y salud infantil	9
2.2. Recomendaciones y epidemiología actual	11
2.3. Evaluación de la actividad física	12
2.4. Actividad física y longitud del telómero	15
3. Comportamientos sedentarios	17
3.1. Comportamientos sedentarios y salud infantil	17
3.2. Recomendaciones y epidemiología actual	19
3.3. Evaluación de los comportamientos sedentarios	21
3.4. Comportamientos sedentarios y longitud del telómero	22
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	26
METODOLOGÍA	27
1. Diseño y población de estudio	27
2. Aspectos éticos.....	28
3. Variables de estudio	29
3.1. Longitud del telómero leucocitario	29
3.2. Actividad física	31
3.3. Comportamientos sedentarios.....	32
3.4. Covariables de estudio	32
4. Análisis estadístico.....	33
RESULTADOS	36

Actividad física extracurricular y longitud del telómero.....	36
Resumen.....	36
Resultados	36
Publicación I.....	40
Resumen.....	40
Resultados	40
Publicación II	45
Resumen.....	45
Resultados	45
DISCUSIÓN.....	50
1. Limitaciones y fortalezas generales del estudio	54
CONCLUSIONES.....	56
CONCLUSIONS	57
IMPLICACIONES PARA LA SALUD PÚBLICA.....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	71
Anexo 1 - Artículo científico correspondiente a la publicación I	72
Anexo 2 - Artículo científico correspondiente a la publicación II	92
Anexo 3 - Código de Investigación Responsable (COIR)	104
AGRADECIMIENTOS	106

LISTADO DE ACRÓNIMOS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AF: Actividad Física

AFE: Actividad Física Extracurricular

AFMV: Actividad Física Moderada-Vigorosa

BiB: Born in Bradford

CCI: Coeficiente de Correlación Intraclase

CIS: Calibración Inter-Serie

CLASS: Children Leisure Activity Study Survey

CPAQ: Children's physical activity questionnaire

CRP: Proteína C reactiva

CS: Comportamientos Sedentarios

DE: Desviación Estándar

IDEFICS: Identification and prevention of dietary-and lifestyle-induced health effects in children and infants

EDEN: Étude des Déterminants pré et postnatals du développement et de la santé de l'Enfant

HELIX: Human Early Life Exposome

IC: Intervalo de Confianza

IL-6: Interleucina 6

IMC: Índice de Masa Corporal

INMA: Infancia y Medio Ambiente

IPAQ: International Physical Activity Questionnaire

LT: Longitud del telómero

MET: Índice Metabólico Equivalente

NHANES: National Health and Nutrition Examination Survey

OMS: Organización Mundial de la Salud

Q-FISH: Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa

RI: Rango Intercuartílico

rMED: Relative Mediterranean Diet Score

ROC: Característica Operativa del Receptor

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno

S: Gen de copia única de referencia

STELA: Single Telomere Length Analysis

T: Señal telomérica

TERC: Componente Ribonucleotídico

TERT: Telomerasa Transcriptasa Inversa

TesLA: Telomere Shortest Length Assay

TRF: Terminal Restriction Fragment analysis

TRF1: Factores de unión a Repeticiones Teloméricas 1

TRF2: Factores de unión a Repeticiones Teloméricas 2

TVP: Tiempo de Visionado de Pantallas

U-STELA: Single Telomere Length Analysis

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama simplificado de la estructura del telómero	1
Figura 2. Diagrama simplificado del acortamiento del telómero por replicación celular	2
Figura 3. Funcionamiento y cálculo de la longitud de la LT relativa a través del T/S ratio usando qPCR	3
Figura 4. Correlaciones de Pearson entre LT sanguínea relativa y LT relativa de tejidos humanos específicos (con IC95%)	6
Figura 5. Factores ambientales que influyen en el mantenimiento de la LT	8
Figura 6. Salud y actividad física en la infancia	11
Figura 7. Recomendaciones de realización de actividad física en la infancia y adolescencia (5 - 17 años) según la Organización Mundial de la Salud	12
Figura 8. Ejemplo de monitor de frecuencia cardíaca (A), acelerómetro (B) y podómetro (C). 15	
Figura 9. Esquema del potencial efecto de la actividad física sobre la biología de la longitud del telómero.....	17
Figura 10. Salud y comportamientos sedentarios en la infancia	18
Figura 11. Recomendación sobre la limitación de actividades sedentarias en la infancia y adolescencia (5-17 años) según la Organización Mundial de la Salud	20
Figura 12. Esquema del potencial efecto de los comportamientos sedentarios sobre la biología de la longitud del telómero.....	23
Figura 13. Localización geopolítica de las cohortes participantes en el proyecto Infancia y Medio Ambiente	27
Figura 14. Gráfico de Bland-Altman representando el sesgo medio y los límites de acuerdo al 95% entre los minutos/día en actividad física moderada-vigorosa medidos por el cuestionario y los acelerómetros.....	49

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Comparación entre los métodos más utilizados para evaluar la longitud del telómero .	5
Tabla 2. Resumen de las muestras y kits de extracción de ADN utilizados.....	29
Table 3. Características de las parejas madre-hijo/a a los 4 años (n= 639)	37
Tabla 4. Asociación entre la media de gasto energético en actividad física extracurricular (METs hora/día) y longitud del telómero a los 4 años (n= 639) y el cambio en el ranking de la longitud del telómero entre los 4 y 8 años (n= 547).....	39
Tabla 5. Características de las parejas madre-hijo/a del estudio INMA en función de los terciles de tiempo total en comportamientos sedentarios (horas/día) a los 4 años	41
Tabla 6. Asociación entre comportamientos sedentarios en terciles (horas/día) y longitud del telómero a los 4 años y cambios en el ranking de la longitud del telómero de los 4 a los 8 años.	44
Tabla 7. Características de las parejas madre-hijo/a en función de su cohorte de origen y edad de los niños/as	46
Tabla 8. Resultados de la regresión lineal de la diferencia entre el tiempo en actividad física moderada-vigorosa medida por el cuestionario y los acelerómetros ajustada por las características de las parejas madre-hijo/a.....	48
Tabla 9. Validez para identificar niños/as que acumularon ≥ 60 minutos/día de actividad física moderada-vigorosa según la acelerometría en el cuestionario.	49

PRESENTACIÓN

La presente tesis doctoral titulada “Influencia de la actividad física y las conductas sedentarias en la longitud del telómero en la infancia: Proyecto TeloDiPA” se adscribe al Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH), el cual se rige por la normativa de estudios de doctorado de la UMH, aprobada por el Consejo de Gobierno del 30 de mayo de 2012 al amparo del Real Decreto 99/2011. A su vez, esta tesis doctoral se presenta mediante la modalidad de compendio de publicaciones y opta a la mención de Doctorado Internacional por la UMH.

El trabajo científico realizado se enmarca en el estudio *Dieta y actividad física en embarazo y tras el nacimiento y longitud del telómero en niños y adolescentes: Proyecto TeloDiPA* liderado por la Dra. Eva María Navarrete Muñoz (PI1800825). Además, este proyecto utiliza datos pertenecientes al proyecto Infancia y Medio Ambiente (INMA, <https://www.proyectoinma.org/>), un estudio de cohortes de nacimiento prospectivo y multicéntrico de base poblacional que se desarrolla en diversas áreas de España. En relación con la mención de Doctorado Internacional, en el año 2021 realicé una estancia predoctoral de 3 meses en la Universiteit Hasselt (<https://www.uhasselt.be/nl>) con el Dr. Dries Martens y el Dr. Tim Nawrot, expertos a nivel mundial en medición de la longitud del telómero y el estudio de sus factores de riesgo medioambientales. Esta estancia fue una experiencia muy enriquecedora que me permitió aprender sobre análisis epidemiológicos avanzados aplicados a la longitud del telómero.

La presentación de esta tesis doctoral sigue una estructura tradicional donde se inicia con una introducción que pretende contextualizar y relacionar entre sí los conceptos de longitud del telómero, actividad física y comportamientos sedentarios durante la infancia. Tras esta presentación, se expone la justificación, la hipótesis y los objetivos planteados en este trabajo. A continuación, se presenta la metodología empleada con una visión general del estudio INMA, su diseño, participantes y la descripción detallada de las variables principales y análisis estadísticos empleados. Posteriormente se muestran los resultados obtenidos en referencia a los objetivos planteados y se analizan a nivel general en el apartado de discusión. Por último, se resumen las principales conclusiones extraídas de esta tesis doctoral y se presentan las posibles implicaciones de este trabajo para la salud pública actual.

RESUMEN

Antecedentes y objetivos

Los telómeros son nucleoproteínas situadas en los extremos de nuestros cromosomas que actúan protegiendo al genoma de los efectos de la degradación cromosómica. La longitud de los telómeros (LT) decrece de forma natural con cada replicación celular. Sin embargo, la velocidad de acortamiento puede verse incrementada por la acción del estrés oxidativo y procesos inflamatorios. En este sentido, se ha observado que los comportamientos sedentarios (CS) podrían acelerar este acortamiento debido a su relación con el aumento de biomarcadores inflamatorios. Al contrario, la actividad física (AF) podría actuar manteniendo la LT mediante su efecto antiinflamatorio y antioxidante a través de la activación de la telomerasa, una encima capaz de añadir nuevos segmentos teloméricos. A pesar del probable efecto de estos estilos de vida sobre la LT, es muy escasa la evidencia actual sobre la AF/CS y LT en la infancia. La importancia de evaluar esta asociación radica en que la LT se acorta pronunciadamente en la infancia y adolescencia debido al mayor volumen de replicaciones celulares que se produce en este momento del desarrollo. Por ello, la presencia de factores que puedan incrementar y/o mantener la LT durante las primeras etapas de vida podrían condicionar el envejecimiento celular durante la infancia hasta la adultez.

Debido a lo anteriormente expuesto, los objetivos de esta tesis doctoral han sido explorar la asociación entre AF extracurricular (AFE)/CS y la LT de niños/as entre los 4 y los 8 años en el estudio Infancia Medio Ambiente (INMA). A su vez, y con el fin de establecer un punto de partida para realizar futuras investigaciones sobre la relación entre la AF y la LT en otras etapas de la infancia, se planteó evaluar la validez de la información de AF moderada-vigorosa (AFMV) recogida mediante un cuestionario en niños/as de 6 a 12 años pertenecientes al estudio INMA y de las cohortes de INMA Sabadell, Born in Bradford (BiB), y Étude des Déterminants pré et postnataux du développement et de la santé de l'Enfant (EDEN) pertenecientes al proyecto europeo Human Early Life Exposome (HELIX).

Métodos

Se utilizaron datos pertenecientes al proyecto INMA, un estudio epidemiológico de cohortes de nacimiento de base poblacional con carácter prospectivo y multicéntrico. Específicamente, este trabajo ha empleado datos de INMA Asturias, Guipúzcoa y Sabadell. En total, 610 niño/as a los 8 años (Asturias = 204, Guipúzcoa = 134 y Sabadell = 272) presentaban medidas repetidas de la LT a los 4 y 8 años. En el caso de la validación del cuestionario de AF, se incluyeron 230 niños/as que disponían de información de AF procedente de cuestionario y

acelerometría INMA Guipúzcoa (n = 136, 10-12 años), HELIX Sabadell (n = 37, 9 años), HELIX BiB (n= 27, 6 años) y HELIX EDEN (n= 30, 11 años).

La LT leucocitaria fue determinada mediante un protocolo modificado de PCR cuantitativa a partir de una muestra de sangre o plasma sanguíneo. Por tanto, se dispone de la LT a los 4 y los 8 años. Para el análisis a los 4 años, la LT se utilizó como % cambio, mientras que en los análisis entre los 4 y los 8 años se calculó el cambio en la diferencia de ranking. La AFE se obtuvo mediante un cuestionario reportado por los progenitores en la visita de seguimiento a los 4 años y se calculó la media de gasto energético diario en índices metabólicos equivalentes (MET) por hora/día a través de ese cuestionario. El tiempo en CS de los niños/as a los 4 años fue reportado por los progenitores mediante un cuestionario basado en el Children Leisure Activity Study Survey (CLASS). Específicamente, se preguntó a los progenitores cuántas horas pasaba su hijo/a viendo la televisión/vídeos (tiempo de visionado de pantallas, TVP) o realizando otros CS entre semana y los fines de semana fuera del colegio. Se calculó la media diaria de horas en TVP, otros CS y tiempo total en CS. En los análisis tanto AFE como las variables de CS se categorizaron en tertiles de su distribución.

En el caso de la validación del cuestionario de AF, se emplearon datos de AFMV total reportada por los progenitores mediante el cuestionario CLASS y recogida de forma directa mediante acelerometría usando GeneActiv en INMA Guipúzcoa y ActiGraph wGT3X-BT en HELIX.

La asociación transversal entre AFE/CS y LT a los 4 años y entre los 4 y 8 años se exploraron mediante modelos de regresión robusta múltiple. La LT de los niños/as de Sabadell a los 8 años fue determinada utilizando un protocolo ligeramente diferente de qPCR. Por ello, se usó la diferencia en el ranking de la LT entre los 4 y 8 años como medida resultado para explorar estas asociaciones. En el caso de los análisis de validación, se calculó la diferencia media entre las medidas de minutos/día de AFMV reportadas por el cuestionario y los acelerómetros. Además, los factores asociados a esta diferencia se exploraron mediante regresión lineal robusta múltiple. El acuerdo entre ambos métodos se examinó a través de un gráfico de Bland-Altman. Respecto a la validez concurrente para medir AFMV, se analizó mediante correlaciones parciales de Spearman ajustadas por la cohorte de origen. Por último, el análisis de la curva ROC fue empleado para comprobar la precisión del cuestionario para identificar niños/as físicamente activos según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Resultados

Al explorar la asociación entre AFE y la LT, se observó que aquellos niños/as situados en el tercil más alto de gasto energético en AFE (11,9-31,0 METs hora/día) mostraron un incremento en el ranking de la LT del 2,25% (IC95%: 0,01; 4,48; p= 0,04) entre los 4 y 8 años,

en comparación con aquellos localizados en el tercil más bajo (2,2-7,8 METs hora/día). No se observó ninguna asociación estadísticamente significativa en el caso de los terciles bajo vs medio. En relación a los CS, los resultados mostraron que los niños/as que pasaban más tiempo en TVP a los 4 años (1,6-5,0 horas/día) presentaban una disminución de la LT del 3,9% (IC95%: -7,4; -0,4; $p = 0,03$) en comparación con el tercil más bajo (0,0-1,0 horas/día). Respecto al periodo entre los 4 y 8 años, un mayor TVP (tercil más alto vs tercil más bajo) se asoció con una disminución en el ranking de la LT del 1,9% (IC95%: -3,8; -0,1; $p = 0,03$). Por último y en referencia a la validación del cuestionario de AF, se observó una correlación moderada entre las medidas de AFVM de ambos métodos ($\rho = 0,41$; $p < 0,001$). El ser niña se asoció estadísticamente con la diferencia de AFMV entre ambos métodos. Además, se determinó puntos de corte separados por niño y niña para clasificar a los/as físicamente activos del cuestionario frente a la acelerometría (área bajo la curva = 83,8% y 82,7% para niños y niñas, puntos de corte = 68,6 y 45,4 minutos/día de AFMV, respectivamente).

Conclusiones

Los resultados anteriormente expuestos nos permiten concluir que aquellos niños/as expuestos a un mayor gasto energético en AFE a los 4 años se asoció con un aumento en el ranking de la LT entre los 4 y 8 años. Inversamente, se observó que aquellos niños/as que presentaban mayor TVP a los 4 años mostraron una menor LT a los 4 años y entre los 4 y 8 años de edad. Por último, la validez de las medidas de AFMV entre el cuestionario evaluado y el acelerómetro fue moderada, por lo que las estimaciones individuales deben ser consideradas con cautela. Sin embargo, este cuestionario mostró una aceptable precisión a la hora de detectar niños/as físicamente activos según la OMS.

SUMMARY

Background and objectives

Telomeres are nucleoproteins located at the ends of chromosomes that protect the genome from the effects of chromosomal degradation. The telomere length (TL) naturally decreases with each cell replication. However, oxidative stress and inflammatory processes can increase the shortening rate. In this sense, sedentary behaviors (SB) have been observed to potentially accelerate telomere shortening due to their association with increased inflammatory biomarkers. On the contrary, physical activity (PA) may help maintain the TL through its anti-inflammatory and antioxidant effects by activating telomerase, an enzyme capable of adding new telomeric segments. Despite the likely impact of lifestyles on TL, there is limited evidence exploring PA/SB and TL in childhood. During these early developmental stages, TL shortening significantly accelerates due to the higher volume of cell replication. Therefore, the presence of factors that can increase and/or maintain TL during early life stages may influence cellular ageing from childhood to adulthood.

For these reasons, the aim of this doctoral thesis was to investigate the association between extracurricular physical activity (EPA)/SB and TL in children aged 4 to 8 years in the Infancia Medio Ambiente (INMA) study. Additionally, the validity of moderate-to-vigorous physical activity (MVPA) information collected through a questionnaire in children aged 6 to 12 years belonging to INMA, and from the cohorts INMA Sabadell, Born in Bradford (BiB), and Étude des Déterminants pré et postnatals du développement et de la santé de l'Enfant (EDEN) was also evaluated in order to establish a baseline for future research on the relationship between PA and TL in other stages of childhood. The cohorts INMA Sabadell, BiB and EDEN are part of the Human Early Life Exposome (HELIX) project.

Methods

This doctoral thesis used data from the INMA project, a prospective and multicenter cohort study of Spanish population-based birth cohorts. Specifically, data from INMA Asturias, Guipúzcoa, and Sabadell were included. A total of 610 children (Asturias = 204, Gipuzkoa = 134, Sabadell = 272) had repeated measurements of TL at 4 and 8 years. For the validation of the PA questionnaire, data from 230 children with both questionnaire and accelerometry measurements of PA were used, including data from INMA Gipuzkoa (n = 136, 10-12 years), HELIX Sabadell (n = 37, 9 years), HELIX BiB (n = 27, 6 years), and HELIX EDEN (n = 30, 11 years).

The leukocyte TL was measured using a modified quantitative PCR protocol from blood or buffy coat samples. In addition, TL was measured at 4 and at 8 years. For the 4 years analysis,

the TL was used as % of change, while the % of change in ranking was used for the analysis from 4 to 8 years. Regarding EPA, it was obtained from a parent-reported questionnaire during the follow-up visit at 4 years of age. The average daily energy expenditure in EPA was calculated in metabolic equivalent of task (MET) per hour/day. This variable was transformed into tertiles. The time spent in SB by children at 4 years of age was reported by parents using a questionnaire based on the Children Leisure Activity Study Survey (CLASS). Specifically, parents were asked how many hours their child spent watching television/videos (screen time) or engaging in other SB activities on weekdays and weekends outside of school. The daily average of hours spent in screen time, other SB, and total SB were calculated and these variables were used in tertiles for analysis purposes.

Regarding the PA questionnaire validation, the parent-reported MVPA measures were obtained using a questionnaire based on the CLASS, while the direct measurements were using an ActiGraph wGT3X-BT accelerometer in the case of HELIX and a GeneActiv accelerometer in INMA Gipuzkoa.

The cross-sectional association between EPA/SB and TL at 4 years and between 4 and 8 years of age were examined using multiple robust linear regression models. A different qPCR protocol was used for TL measurement in Sabadell children at 8 years of age. Thus, difference in the TL ranking between 4 and 8 years was used as the outcome measure to explore these associations. The mean difference between minutes/day of MVPA reported by the questionnaire and accelerometers was calculated for the validation analyses. The possible factors associated with this difference were explored using multiple robust linear regression. The agreement between both methods was examined using a Bland-Altman plot. In addition, the concurrent validity of the questionnaire for measuring MVPA was analyzed using partial Spearman correlations adjusted for the cohort of origin. Finally, ROC curve analysis was employed to check the accuracy of the questionnaire in identifying physically active children according to the World Health Organization (WHO) guidelines.

Results

The results showed that children in the highest tertile of mean daily energy expenditure in EPA (11,9-31,0 METs hours/day) showed a 2,25% increase in TL ranking (95%CI: 0,01; 4,48; $p = 0,04$) between 4 and 8 years of age, compared to those in the lowest tertile (2,2-7,8 METs hours/day). No statistically significant association was observed between the low and medium tertiles. In relation to SB, the results showed that children who spent more hours in screen time at 4 years of age (1,6-5,0 hours/day) presented a -3,9% decrease in TL (95%CI: -7,4; -0,4; $p = 0,03$) compared to the lowest tertile (0,0-1,0 hours/day). For the period between 4 and 8 years of age, higher screen time (highest tertile vs lowest tertile) was associated with a -1,9% decrease in TL

ranking (95%CI: -3,8; -0,1; $p = 0,03$). Finally, regarding the validation of the PA questionnaire, a moderate correlation was observed between the measure of MVPA from both methods ($\rho = 0,41$; $p < 0,001$). Being a girl was statistically associated with the difference in MVPA between methods. Furthermore, this questionnaire identified sex-different cut-points to classify physically active children based on accelerometry (area under the curve = 83,8% and 82,7% for boys and girls, cutoff points = 68,6 and 45,4 minutes/day of MVPA, respectively).

Conclusions

Higher energy expenditure in EPA at 4 years of age was associated with an increase in TL ranking between 4 and 8 years of age. Conversely, it was observed that children who spent higher screen time at 4 years of age showed a decrement in TL at 4 and between 4 and 8 years of age. Finally, the validity of the MVPA measures between the evaluated questionnaire and the accelerometer was moderate, so individual estimates should be considered with caution. However, this questionnaire showed acceptable accuracy in detecting physically active children according to the WHO guidelines.

INTRODUCCIÓN

1. Los telómeros

1.1. Origen, biología y estructura

El estudio del envejecimiento celular ha cobrado relevancia desde que Elizabeth Blackburn descubrió en 1978 el mecanismo por el cual se limita la esperanza de vida de nuestras células: la longitud del telómero (LT) (1). Este importante hito le fue reconocido mediante el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2009 y puso el foco en una nueva rama de investigación sobre el envejecimiento.

Los telómeros son nucleoproteínas localizadas en los extremos de nuestros cromosomas (1,2). Estas estructuras actúan estabilizando el genoma y protegiendo al ácido desoxirribonucleico (ADN) de los efectos de la degradación cromosómica e incluso, previenen la fusión de los cromosomas homólogos durante la replicación celular (2,3). De forma estructural, los telómeros están formados por secuencias repetitivas simples de ADN no codificante ricas en guanina. En humanos, el telómero consiste en 4-12 kilobases (kb) de hexanucleótidos [5'-TTAGGG-3'] (**Figura 1**) (2). La secuencia final rica en guanina del telómero se pliega sobre si misma creando el T-Loop, el cual representa su primera barrera de defensa frente a su acortamiento (2,3).

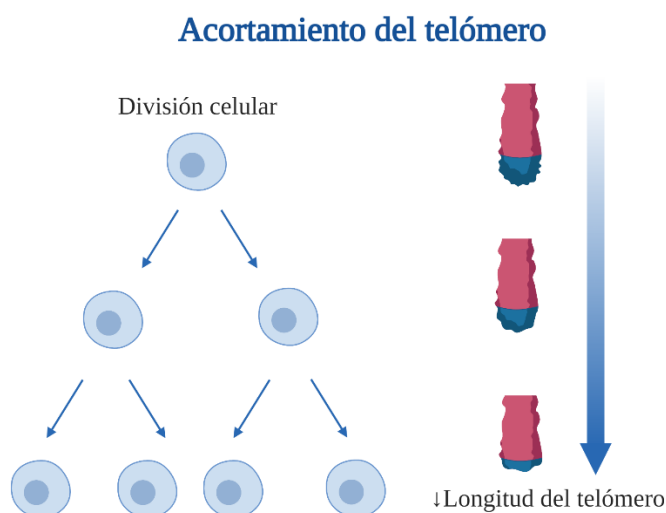
Figura 1. Diagrama simplificado de la estructura del telómero. Fuente: Elaboración propia mediante BioRender.com



La LT decrece de forma natural entre 20-200 pares de bases (bp) con cada replicación celular debido al problema del final de la replicación, en la cual una parte final del ADN no se replica y se pierde (**Figura 2**) (4). Sin embargo, la velocidad de esta degradación puede verse incrementada por otros agentes dañinos para el ADN como las especies reactivas del oxígeno, que forman parte del ciclo metabólico celular y de los procesos inflamatorios (5). Debido al alto contenido de guanina de los telómeros, las especies reactivas del oxígeno o ROS (Reactive Oxygen

Species, en inglés), pueden producir pérdidas de la LT a través de rupturas monocatenarias (6,7). Este impacto del estrés oxidativo se suma a la baja capacidad de reparación de estos daños por parte del telómero, lo cual intensifica este efecto (8).

Figura 2. Diagrama simplificado del acortamiento del telómero por replicación celular. Fuente: Elaboración propia mediante BioRender.com



Sin embargo, el telómero presenta diversos mecanismos para tratar de compensar esta pérdida de longitud. El principal de ellos ocurre a través de la shelterina, una estructura proteica unida al telómero que tiene un rol clave en la activación de la telomerasa (9). La telomerasa es una encima formada por telomerasa transcriptasa inversa (TERT) y un componente ribonucleotídico (TERC) (10). Esta encima es la encargada de reconocer el final 3' rico en guanina del telómero y añadir a este extremo nuevas secuencias teloméricas, siendo el principal mecanismo para la elongación de la LT (10). A pesar de este mecanismo, cuando la LT se acorta de forma crítica, la célula corre el riesgo de entrar en senescencia y/o apoptosis (11,12). Este tipo de células pierden por completo su actividad metabólica y su acumulación, sobre todo de células senescentes, es considerada un factor de envejecimiento de los tejidos y se relaciona con la aparición de patologías (12). A consecuencia de esta relación, se comenzó a desarrollar tecnología robusta y fiable para cuantificar la LT.

1.2. Métodos de medición

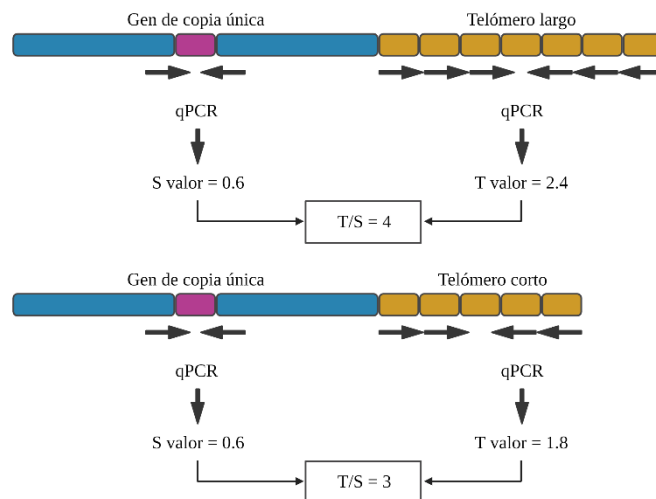
Debido al interés de estudio a nivel epidemiológico de los factores asociados a la LT, han surgido diferentes metodologías para su medición cuantitativa. En primer lugar, se debe considerar que la metodología más adecuada varía en función de si el investigador/a prioriza el rendimiento, la exactitud o el análisis causa-efecto. A su vez, existen técnicas más efectivas para utilizarse en un gran número de individuos, mientras que otros métodos son más adecuados para una pequeña muestra debido a que son más específicos y/o laboriosos. Sin embargo, lo cierto es

que toda metodología presenta sus ventajas y desventajas. En la actualidad, diversas revisiones han abordado las técnicas para la medición de la LT (13,14), entre las cuales destacan (**Tabla 1**):

a) Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, ampliamente conocida como qPCR debido a sus siglas en inglés (Quantitative Polymerase Chain reaction), es una de las técnicas más extendidas para cuantificar LT en estudios epidemiológicos. Este hecho se debe a su sencillez, su alto rendimiento al procesar grandes números de muestras, a la baja cantidad de ADN inicial necesario (50 ng aproximadamente) y a su bajo coste (15). La qPCR orientada a la medición de la LT fue originalmente descrita por Cawthon en 2002 y se basa en medir la señal telomérica (T) en base a la señal de un gen de copia única de referencia (S). Ambas medidas son posteriormente utilizadas para calcular el LT ratio (T/S) relativo a las muestras evaluadas (**Figura 3**) (15,16). Esta medición es su principal desventaja, ya que la qPCR cuantifica la LT en forma de valores relativos y no absolutos (pares de bases). A pesar de la utilidad de la qPCR, esta ostenta diversas limitaciones. La qPCR presenta dificultades en detectar telómeros excesivamente cortos. Además, se ha observado una amplia variabilidad entre muestras y entre laboratorios debido tanto al uso de modificaciones en el protocolo que pueden afectar al T/S ratio, como al uso de diferentes primers para detectar el gen de copia única (17).

Figura 3. Funcionamiento y cálculo de la longitud de la LT relativa a través del T/S ratio usando qPCR. Fuente: Elaboración propia mediante BioRender.com, basado en Lai et al., 2017.



b) Terminal Restriction Fragment analysis (TRF)

Establecida por diversos autores/as como la técnica “Gold Standard” para determinar la LT, el análisis del fragmento de restricción terminal o TRF (Terminal Restriction Fragment analysis) evalúa la LT usando las manchas de Southern blots. La técnica se realiza digiriendo los fragmentos de ADN de forma que las enzimas utilizadas dejen intactos los segmentos teloméricos.

Tras esto, se realiza una electroforesis en gel y se visualizan los segmentos teloméricos mediante Southern blot (18–20). La LT media se cuantifica en función de la intensidad de las manchas del Southern blot. A pesar de la precisión y reproducibilidad de esta técnica, se requiere de un gran volumen de ADN inicial (3-4 mg aproximadamente). Además, su protocolo es largo y laborioso, lo que limita su uso en grandes estudios epidemiológicos. A su vez, presenta dificultad en detectar telómeros muy cortos (18–20).

c) Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization (Q-FISH)

La técnica comercial conocida como Q-FISH (Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization) o Hibridación fluorescente cuantitativa In Situ, fue diseñada para observar los genes, cromosomas o sus partes en células y tejidos. Esta metodología se basa en la preparación de muestras de ADN junto a un agente fluorescente que se unirá al telómero, aunque existen diferentes variedades. En primer lugar, la Q-FISH Interfase usa la microscopía para determinar y cuantificar la intensidad de la fosforescencia del telómero (21). Por otra parte, la Q-FISH Metafase se utiliza para medir la LT de cada cromosoma, pero requiere de células en proceso de proliferación (22). Finalmente, encontramos la metodología Flow FISH, la cual determina la TL a través de citometría de flujo (23). Las principales desventajas de las técnicas Q-FISH son su coste, bajo rendimiento y protocolos intensivos. Además, el Q-FISH no detecta adecuadamente los telómeros con repeticiones por debajo del umbral de hibridación de la sonda fluorescente (23).

D) Single Telomere Length Analysis (STELA)

El análisis de la longitud de telómero único o STELA (Single Telomere Length Analysis) en inglés, es una metodología diseñada para medir LT en cromosomas individuales y específicos (24). Esta metodología emplea una combinación de PCR y Southern blot para medir la abundancia de telómeros cortos. Las principales ventajas de este método incluyen la capacidad de detección de telómeros cortos, el uso de poco material biológico y la posibilidad de evaluar la LT en cromosomas específicos (24). Inicialmente, una de las principales limitaciones de STELA era que no todos los extremos cromosómicos disponían de un primer para su medición. Por ello, en 2010 fue introducido el protocolo de STELA Universal (U-STELA) (25), capaz de detectar los telómeros de cualquier extremo cromosómico. Sin embargo, tanto STELA como U-STELA son metodologías que utilizan un protocolo de trabajo intensivo y presentan bajo rendimiento, por lo que no suelen ser empleadas a gran escala (24,25).

e) Telomere Shortest Length Assay (TesLA)

La prueba de la longitud telomérica más corta o TesLA (Telomere Shortest Length Assay) en inglés, combina un protocolo modificado de Southern blot con un software de procesamiento de imagen para medir automáticamente la distribución del telómero en diferentes longitudes

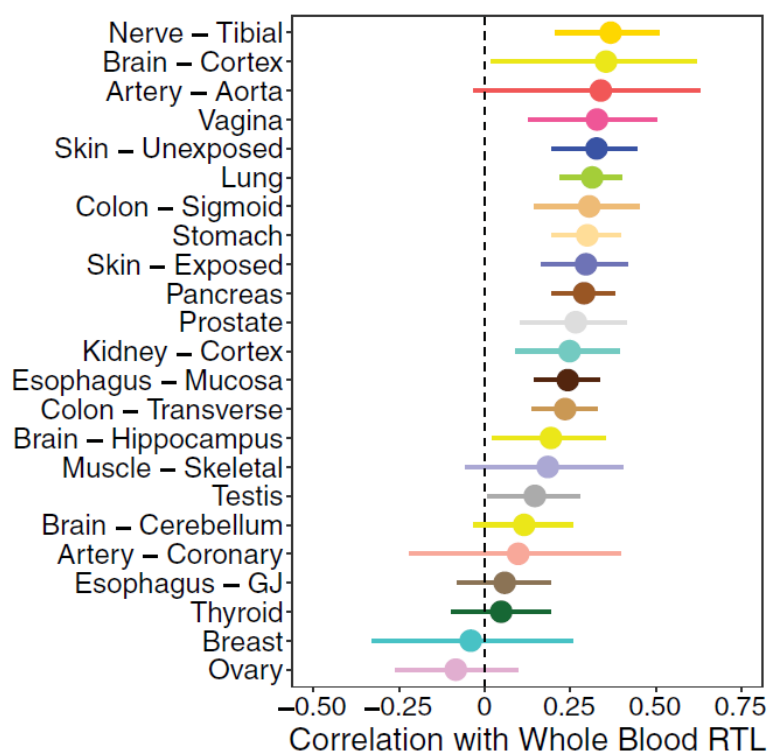
(26,27). TesLA permite cuantificar la cantidad de telómeros con longitudes desde <1 kb hasta 18 kb utilizando, además, menos de un microgramo de ADN. Entre las principales ventajas de TesLA destaca la posibilidad de evaluar cambios en la TL en cortos periodos de tiempo (26,27). Sin embargo, y pese a ser una técnica sensible y precisa, es a su vez laboriosa, presenta un bajo rendimiento y no permite medir telómeros muy largos (26,27).

Tabla 1. Comparación entre los métodos más utilizados para evaluar longitud del telómero.

Método	Principales ventajas	Principales desventajas
qPCR	-Protocolo sencillo -Bajo volumen de ADN inicial	-Alta variabilidad -Cuantifica a nivel relativo -No detecta telómeros muy cortos
TRF	-Reproducible -Alta precisión -Resultados comparables	-Protocolo intensivo -Alto volumen de ADN inicial -Cuantifica LT media -No detecta telómeros muy largos
Q-FISH	-Puede medir todos los cromosomas	-Protocolo intensivo -Requiere de equipamiento costoso -Cuantifica en fluorescencia relativa
Flow FISH	-Puede medir todos los cromosomas -Reproducible	-Protocolo intensivo -Equipamiento costoso
STELA	-Detecta los telómeros más cortos de cromosomas específicos -Alta precisión	-Bajo rendimiento -Protocolo intensivo -No detecta telómeros muy largos
TeSLA	-Mide telómeros desde <1 kb hasta 18 kb	-Bajo rendimiento -Protocolo intensivo -No detecta telómeros muy largos

Otro de los aspectos más importantes a tener en cuenta a la hora de evaluar la LT es la fuente inicial del ADN. Numerosos proyectos epidemiológicos utilizan muestras de sangre, su capa leucocitaria o saliva debido a la facilidad de obtención. Sin embargo, la mayor parte de los estudios emplean la LT proveniente de una muestra sanguínea periférica. No obstante, diversos investigadores/as se preguntaron si esta LT sanguínea estaba correlacionada con los demás tejidos del cuerpo (28,29). Por ello, estudios como el realizado por Demanelis y colegas (30) mostraron que la LT sanguínea relativa estaba positivamente correlacionada con la LT relativa de los diferentes tejidos humanos, haciendo de esta LT un proxy válido y útil en grandes proyectos epidemiológicos (**Figura 4**).

Figura 4. Correlaciones de Pearson entre LT sanguínea relativa y LT relativa de tejidos humanos específicos (con IC95%). Fuente: Demanelis et al., 2020.



1.3. Telómeros y salud

La LT como biomarcador de edad biológica ha sido empleada durante las últimas dos décadas para explorar su conexión con diversas patologías relacionadas con el envejecimiento humano. En particular, actualmente contamos con revisiones sistemáticas y metaanálisis que asocian el acortamiento de la LT con la aparición de enfermedades de relevancia como las cardiovasculares, el cáncer, la diabetes y el Alzheimer (31–34).

Las enfermedades cardiovasculares se encuentran entre las primeras causas de muerte y discapacidad según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (35). La disfunción telomérica provocada por el acortamiento de la LT provocaría un aumento de células vasculares senescentes y con ello, una reducción de la función cardíaca (31). De hecho, existe evidencia que relaciona la baja LT con la formación de placas ateroscleróticas (36,37). La teoría de esta relación establece que la acumulación de células senescentes provoca un estado de inflamación crónica, el cual desencadenaría secuencias de reparación tisular a través de la expresión de factores de crecimiento, citocinas y proteasas (31). Sin embargo, estos procesos podrían a su vez impulsar patologías cardiovasculares como la aterosclerosis o la arritmia (31). A pesar de que los estudios que asocian la presencia de patologías a la LT en las primeras etapas de la vida son muy escasos,

existe evidencia de que la LT al nacimiento se asocia inversamente con la presión sanguínea en la infancia (38).

Unido a las enfermedades cardiovasculares, el cáncer también ocupa los primeros puestos en causas de mortalidad mundial (35). El acortamiento progresivo de la LT puede derivar en senescencia y transformación oncogénica de la célula, la cual sufre cambios genéticos y epigenéticos que la convierten en cancerígena (11). Una célula cancerígena es aquella que prolifera sin control ni fin, ya que ha mutado y adquirido la habilidad de mantener constantemente la LT (39). Una menor LT se ha relacionado con una mayor incidencia de algunos tipos de cáncer como el gástrico, posiblemente debido a la mayor replicación celular que tiene lugar en el epitelio estomacal (34).

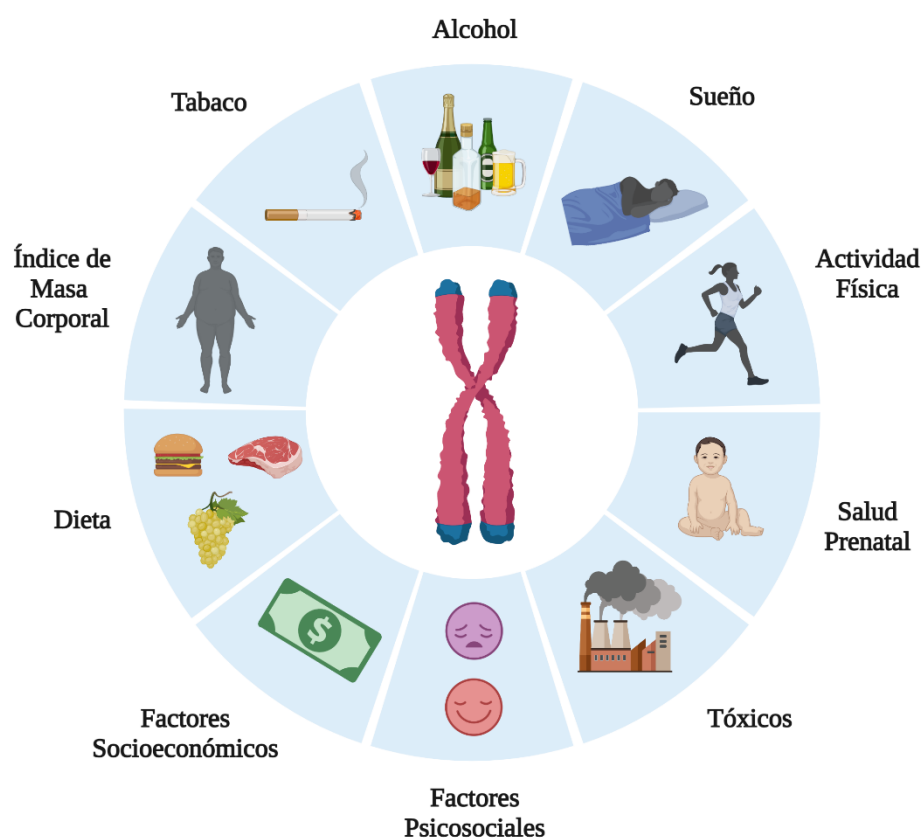
En lo referente a la diabetes, se ha observado que el acortamiento de la LT incrementa el riesgo de daño y apoptosis de células pancreáticas, derivando en el desarrollo y/o progresión de diabetes, específicamente de la diabetes tipo II. (33). Finalmente, unos telómeros muy largos o cortos se han asociado a la presencia de Enfermedad de Alzheimer (34,40). Por un lado, se ha teorizado que los telómeros más largos tienden a acumular daño en el ADN afectando negativamente a la homeostasis celular neuronal (41). Por otro lado, las neuronas con una corta LT podrían incrementar la producción de agentes oxidativos entorpeciendo la función neuronal (40,41).

En resumen, la LT se ha relacionado con la presencia de las principales causas de muerte a nivel mundial. Por ello, no es de extrañar que una menor LT se haya asociado con un incremento del riesgo de mortalidad por todas las causas en población general (32). Debido a la importancia de mantener la LT desde la perspectiva de la salud pública, diversos/as investigadores/as comenzaron a estudiar qué factores externos y potencialmente modificables podían afectar a su longitud.

1.4. Factores ambientales y acortamiento de los telómeros

El acortamiento de forma natural de la LT produce un envejecimiento celular progresivo, el cual se acompaña de una pérdida de función celular (3,4). Sin embargo, la velocidad de este acortamiento puede verse influenciado por diversos factores externos y potencialmente modificables como los estilos de vida (42,43). La acción acumulativa de diferentes estilos de vida como seguir una buena alimentación o reducir el consumo de alcohol podrían producir efectos fisiológicos que derivasen en cambios epigenéticos (42,43). Entre estos efectos destacarían el aumento o la reducción de la inflamación, del estrés oxidativo, los cambios metabólicos y el aumento de la expresión de la telomerasa (11,42). En la actualidad, se han estudiado desde la epidemiología la asociación de algunos de estos factores externos con la LT (**Figura 5**).

Figura 5. Factores ambientales que influyen en el mantenimiento de la LT. Fuente: Elaboración propia mediante BioRender.com



En población adulta se ha observado que la exposición al tabaco y a otros agentes aéreos ligados a la contaminación como las partículas menores a 2,5 micras y los policlorobifenilos están asociados a una menor LT (11,44,45). La entrada de estas sustancias al cuerpo humano provocaría reacciones inflamatorias generando ROS y un mayor desgaste telomérico (44,45). A su vez, la presencia de hábitos de vida poco saludables como la ingesta de alimentos ultraprocesados, el consumo de alcohol o la obesidad misma, se han asociado con una menor LT debido también a su acción inflamatoria y oxidante (46–48). Además, la salud mental parece también tener un papel relevante en el envejecimiento celular. De hecho, los glucocorticoides producidos bajo situaciones de estrés crónico pueden incrementar los niveles de ROS, por lo que aumenta la inflamación sistémica y, por tanto, se produce un acortamiento acelerado de la LT (49). En cambio, seguir estilos de vida saludables como una dieta equilibrada como la mediterránea o mantener un estilo de vida activo con el correcto descanso son factores antioxidantes y antiinflamatorios que favorecen la LT (50–52).

A pesar de que los estudios en población infantil son más escasos que los realizados en adultos, son diversas las investigaciones que han explorado el impacto de estos factores sobre la LT en etapas tempranas de la vida. En particular, en esta población se ha observado el efecto

negativo de la exposición al tabaco, a la polución, presentar obesidad, la ingesta de alimentos ultraprocesados o ricos en azúcares y el estrés (53–56). Por el contrario, se ha identificado que la duración del sueño, la ingesta de frutas/verduras o seguir una dieta mediterránea y la presencia de espacios verdes se encuentran entre los factores protectores de la LT (54,57,58). Las teorías biológicas que soportan esta acción se fundamentan en el equilibrio inflamación-estrés oxidativo que justifica su mismo efecto en la edad adulta (42,59). Sin embargo, este hecho revela la importancia de estudiar la relación entre los hábitos de vida y el envejecimiento celular desde etapas tempranas de la vida como la infancia y la adolescencia.

Esta tesis doctoral se centrará en el efecto sobre la LT de dos importantes estilos de vida potencialmente modificables y de relevancia para la salud pública, la actividad física y los comportamientos sedentarios en la infancia.

2. Actividad física

2.1. *Actividad física y salud infantil*

Entendemos actividad física (AF) por cualquier movimiento corporal producido por la contracción de músculos esqueléticos que requiere de un gasto energético superior al nivel basal (60,61). El gasto energético es habitualmente medido en equivalentes metabólicos o MET (Metabolic equivalent of task), en inglés. Un MET equivale aproximadamente a 3,5 ml de oxígeno/kilo por minuto, el consumo mínimo de oxígeno que requiere nuestro organismo para mantener sus constantes vitales en reposo (62). Por ello, cuando decimos que una actividad tiene una intensidad de 3 METs, significa que requiere un gasto energético 3 veces superior (10,5 ml de oxígeno/kilo por minuto) al estado de reposo (62). Utilizando esta unidad de medida, la AF es generalmente clasificada en ligera (1,5 – 2,9 METs), moderada (3 – 5,9 METs) y vigorosa (≥ 6 METs) (60,61).

La evidencia actual asocia la práctica de AF o ejercicio físico, entendido como una subcategoría de la AF caracterizada por ser planificada, repetitiva y con el objetivo de mejorar o mantener el estado físico o la salud, durante la infancia, con la prevención de diversas patologías y numerosos efectos positivos para la salud (**Figura 6**) (63–66). Entre ellos, mayores niveles de AF se han asociado con un peso corporal saludable en niños/as y adolescentes (63). Además, la AF regular de intensidad moderada-vigorosa (AFMV) y aeróbica es beneficiosa para mantener la salud cardiovascular (63–65,67,68). En particular, se ha asociado a una mejora en la presión sanguínea diastólica/sistólica, en el control de la glucosa, la resistencia a la insulina y un aumento de lipoproteínas de alta densidad (63,67,68). La AF también ha mostrado afectar positivamente a la salud ósea, incrementando su masa, estructura, fuerza y densidad mineral a través de actividades con estimulación ósea como correr o saltar, previniendo posibles fracturas durante la

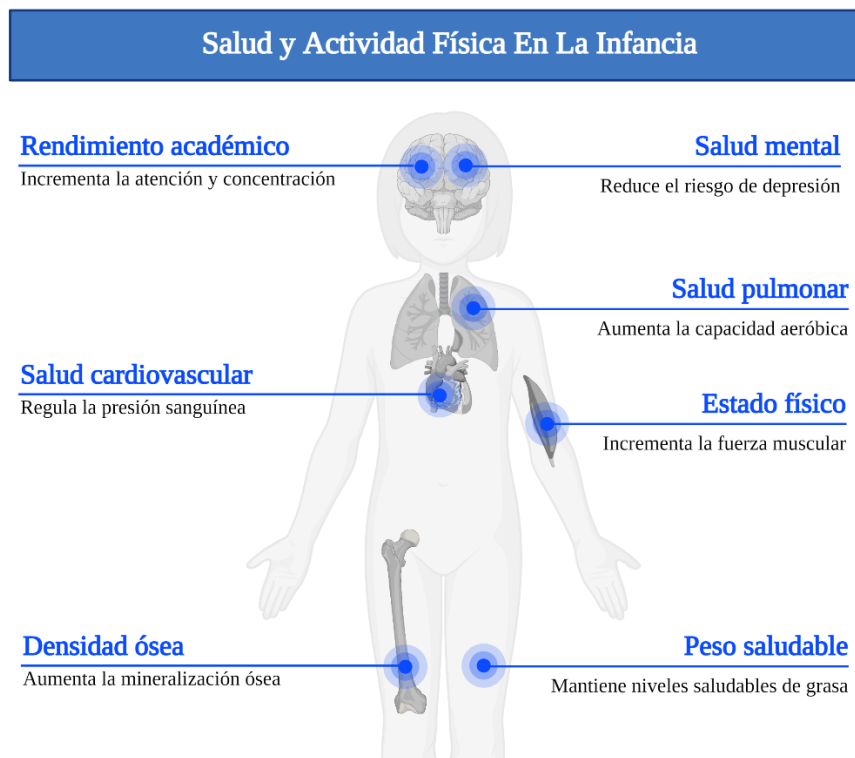
etapa adulta (63–65). A su vez, la AFMV se ha asociado con una mejora en el estado físico a nivel cardiorrespiratorio y musculoesquelético mediante el incremento de la capacidad aeróbica, la flexibilidad, la fuerza y la resistencia muscular (63–65).

Sin embargo, no todos los beneficios que produce realizar AF durante la infancia son de carácter físico. De hecho, los/as niños/as y adolescentes más activos físicamente presentarían un menor riesgo de sufrir depresión y sus síntomas asociados (69). Además, la AF disminuiría la aparición de síntomas depresivos en población joven que ya sufre de depresión de forma comparable a tratamientos farmacológicos (70). A pesar de que los mecanismos biológicos de esta relación todavía tienen que esclarecerse, se teoriza que el ejercicio físico podría inducir un aumento beneficioso de hormonas neurotróficas y una reducción de biomarcadores inflamatorios (71).

Por otra parte, la práctica de AFMV y aeróbica afecta positivamente a la función cognitiva de los niños/as (63–65,72). En especial, se ha observado una mejora en la memoria de trabajo, en la flexibilidad cognitiva y en el control inhibitorio (63–65,72). Unido a este hecho, la AF ha sido asociada a un mejor rendimiento académico (63,72). Este efecto podría tener lugar debido a cambios fisiológicos a nivel cerebral (73–75). Específicamente, realizar AF incrementaría la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos) y la oxigenación de las áreas cerebrales encargadas de las habilidades ejecutivas como el hipocampo o la corteza prefrontal (73–75). Además, se ha observado que los niños/as más físicamente activos podrían presentar un mayor volumen en estructuras de los ganglios basales como el estriado dorsal, estructura mediadora de la cognición, las funciones ejecutivas y el aprendizaje motor (76).

Los hábitos de vida saludables son adquiridos principalmente durante la infancia y la adolescencia, siendo los niños/as físicamente activos los que más probabilidades presentan de mantener una vida activa durante la adultez (77). Este hecho, unido a los potenciales efectos beneficiosos de practicar AF durante la infancia y sus escasos riesgos derivados descritos en la literatura (63), ha provocado que organismos internacionales como la OMS recomiende, de forma prioritaria, realizar AF durante las etapas tempranas de la vida (61).

Figura 6. Salud y actividad física en la infancia. Fuente: Elaboración propia mediante BioRender.com, basado en la Physical Activity Guidelines for Americans 2nd edition.



2.2. Recomendaciones y epidemiología actual

Al resumir los potenciales efectos beneficiosos de practicar AF durante la infancia, surge una importante pregunta: ¿Cuál es la dosis e intensidad más adecuada de AF durante esta etapa de la vida? En realidad, es una cuestión difícil de responder. Muy pocos son los estudios que han explorado el efecto dosis-respuesta de la AF en la infancia, por ello la curva o el mejor punto de corte sigue sin ser bien comprendido en población joven (61,63,64). Sin embargo, los estudios actuales muestran una tendencia que asocia mayores beneficios para la salud a la realización regular de AFMV o de alta intensidad (63–65). En particular, este tipo de AF es la que más impacta positivamente sobre la salud cardiovascular (63–65,67,68). A su vez, poco se conoce sobre el mejor tipo de AF como, por ejemplo, actividades aeróbicas vs entrenamiento muscular. Unido a la intensidad, la evidencia actual muestra que la AFMV aeróbica mostraría mejores beneficios cardiovasculares (63–65,67,68). No obstante, las actividades más ligadas al fortalecimiento muscular serían a su vez necesarias para incrementar el estado físico y la salud ósea de niños/as y adolescentes (63–65).

A pesar de los escasos estudios del efecto dosis-respuesta de la AF en la infancia, existe literatura que identifica el punto de corte de 60 minutos/día de AF como óptimo para obtener los beneficios en salud (63). Por ello, actualmente y desde 2010 la OMS recomienda a niños/as y

adolescentes la realización de al menos 60 minutos al día de AFMV mayoritariamente aeróbica (**Figura 7**) (61). Además, recomienda que 3 veces por semana se deberían incorporar AF vigorosa aeróbica y aquella que fortalezca los músculos y huesos (61). Para finalizar estas recomendaciones, la OMS indica que hacer algo de AF aún sin cumplir las recomendaciones mejorará la salud de los niños/as y concluye que mejor practicar algo de AF que ninguna (61).

Figura 7. Recomendaciones de realización de actividad física en la infancia y adolescencia (5-17 años) según la Organización Mundial de la Salud. Fuente: WHO Guidelines on Physical Activity and Sedentary Behavior 2020.



En 2018, la OMS lanzó su plan de acción mundial sobre actividad física 2018-2030 titulado “Personas más activas para un mundo más sano”. Este plan incluía, entre otros objetivos, la reducción del 10% de la prevalencia de niños/as, adolescentes y adultos insuficientemente activos según sus recomendaciones en 2025 y del 15% en 2030 (78). La importancia de la implantación de políticas para conseguir esta reducción fue apoyada por estudios publicados ese mismo año (79,80). Guthold identificó que, en 2016, el 81,0% (IC95% 76,1-80,4) de los adolescentes entre 11 y 17 años evaluados en 146 países, no cumplían con las recomendaciones de AF de la OMS (79). En el caso de España, esta cifra se situó en el 76,6% (IC95% 73,7-79,3). Por otra parte, el estudio Global Matrix 3.0 liderado por la Active Healthy Kids Global Alliance, evaluó en 2017 el grado de AF de jóvenes entre los 5 y 17 años en 49 países diferentes (80). Entre los indicadores analizados, observaron que el porcentaje de estos jóvenes físicamente activos según la OMS se situaba entre el 34% y 46% (entre el 27% y 33% en el caso de España) (80).

Estos alarmantes datos llevaron a la OMS a volver a dar énfasis a sus recomendaciones en 2022 (61) y mostraron la necesidad de la creación y evaluación de intervenciones para promocionar la AF en etapas tempranas de la vida.

2.3. Evaluación de la actividad física

Los beneficios de la AF en la infancia parecen estar condicionados por la dosis, tipo e intensidad de esta (61,63–65). Por ello, es crucial utilizar instrumentos de evaluación de AF

válidos y fiables tanto en investigación, como para comprobar el efecto de programas de intervención (81). Actualmente, podemos establecer dos tipos de herramientas de evaluación para medir AF en estudios epidemiológicos, las indirectas y las directas.

Los instrumentos indirectos incluyen los cuestionarios y diarios autorreportados, los cuales representan las herramientas más usadas en grandes estudios epidemiológicos para evaluar AF. Este hecho se debe a que son económicos y fáciles de administrar (82). Dependiendo del cuestionario, este puede evaluar individualmente o en conjunto aspectos relacionados con la AF como el tipo, duración o frecuencia durante una ventana de tiempo específica (82,83). A su vez, son usados para identificar el contexto de la AF (p. ej., si la AF es curricular, extracurricular o si se realiza en espacios verdes) (82,83). A pesar de las importantes ventajas que presentan, la validez de las medidas individuales de AF obtenidas mediante estos instrumentos suele ser baja-moderada debido a que están sujetos al sesgo de recuerdo (84,85). Por ello, estos cuestionarios son frecuentemente utilizados para categorizar a los niños/as, por ejemplo, en terciles de actividad física (bajo, medio, y alto) (83,86). Entre otras limitaciones destaca su poca precisión para evaluar actividades de intensidad ligera y, en general, para establecer el gasto energético (82,87). Además, estos cuestionarios son frecuentemente diseñados para ser rellenados por los progenitores, lo que podría ocasionar posibles sesgos al no conocer con precisión la realidad del niño/a (82). Ejemplos de cuestionarios empleados para evaluar AF en la infancia son el Children's Leisure Activities Study Survey (CLASS) o el Children's physical activity questionnaire (CPAQ) (88,89).

Por otra parte, los diarios proveen información mucho más detallada que los cuestionarios. Sin embargo, son más intensivos en tiempo y se encuentran sujetos a un posible sesgo de memoria (82,83,90). Este sesgo se produce en el caso de no completar el diario en tiempo real, ya que la percepción y/o recuerdo del participante se diluye cuanto más se aleja el evento a reportar (90). Uno de los diarios más utilizados para evaluar AF es el de Bouchard, en el cual se divide el día (24 horas) en segmentos de 15 minutos donde debemos registrar si hemos realizado AF en función de una lista de actividades predefinidas (91).

A diferencia de los métodos indirectos, los métodos directos recurren a un dispositivo electrónico para registrar la AF (83). Este método ha resultado popular en la infancia, ya que evitaría el sesgo de recuerdo/memoria (86). No obstante, estos dispositivos presentan un coste muy superior a los cuestionarios y diarios. Además, presentan un protocolo más intensivo que requiere de personal entrenado en el uso del instrumento y que el niño/a lo porte durante un mínimo variable de días (83,86). Entre los dispositivos más utilizados para evaluar AF en estudios epidemiológicos destacan:

a) Monitores de frecuencia cardiaca

Los monitores de frecuencia cardiaca son pequeños dispositivos diseñados para ser llevados cómodamente en la muñeca o en el pecho del participante (**Figura 8A**), cuyo principal objetivo es contabilizar sus contracciones cardíacas (83,86). La frecuencia cardiaca es un indicador fisiológico del gasto energético, frecuencia y duración en AF (83). Sin embargo, estos monitores han mostrado una mejor validez para categorizar el nivel de AF de los participantes (ej. activo, poco activo, sedentario) que para medir dosis exactas (83). La principal desventaja de estos dispositivos es que presentan dificultades de medición sobre todo ante intensidades muy altas o bajas de AF (83,92,93). Estas discrepancias se deben a que la relación lineal entre frecuencia cardiaca-gasto energético puede verse confundida por factores biológicos y ambientales que pueden afectar a la precisión de los monitores, como el consumo de cafeína, el estrés, la posición del cuerpo, la edad, el sexo y/o el estado físico basal del participante (83,92,93).

b) Acelerómetros

Los acelerómetros son sensores (**Figura 8B**) que registran la aceleración del cuerpo en función de tres ejes (X-Y-Z). Esta aceleración recogida tiene en cuenta la direccionalidad y dirección de cada eje y se mide en g (94). Un g equivaldría a la gravedad de la tierra. Estos dispositivos son colocados generalmente en las muñecas o la cadera y recogen esta aceleración con una frecuencia de entre 30-100 Hz (94). Los datos “crudos” son posteriormente transformados de Hz a ventanas de tiempo más largas llamadas *epoch* para facilitar su análisis, siendo el *epoch* de 60 segundos el más común (94,95). No obstante, *epochs* más largos suelen capturar mejor la variabilidad de AF (94,95). Tanto el punto de corte de los *epochs* como de las intensidades de AF (en mg) pueden ser modificados a la hora de transformar los datos crudos (94,95). Esto ha provocado que actualmente no exista un protocolo consensuado de calibración, aumentando la variabilidad de los estudios publicados (94). Este hecho se une a que la calibración también varía en función de dónde esté colocado el acelerómetro. Normalmente, los investigadores/as suelen elegir la muñeca por ser más cómodo para el participante, pero se ha observado que la cintura refleja con más exactitud el gasto energético (94,95). A pesar de su utilidad, las principales limitaciones del uso de acelerómetros son su alto precio y sus largos protocolos de administración (94).

c) Podómetros

Los podómetros son pequeños dispositivos (**Figura 8C**) que miden el número de pasos realizados. Para ello, cuentan con un acelerómetro uniaxial integrado que detecta el balanceo de la cadera cuando esta se ve acelerada verticalmente al dar un paso (83). Debido a su forma de captar AF, el podómetro ha mostrado una buena precisión para actividades ligadas a caminar como running o excursiones (83,96). Además, estos dispositivos, al ser más simples, presentan

un coste medio menor que el de los acelerómetros. Sin embargo, los podómetros no están exentos de limitaciones. En particular, el podómetro no recopila información sobre la intensidad o duración de la AF (83,96,97). Además, la magnitud de la aceleración con la que el podómetro detecta un paso difiere en función de la marca y el modelo (97). Por último, este dispositivo no es capaz de recopilar información de AF que involucre aceleración horizontal (la que involucra mayoritariamente movimientos del miembro superior), la cual se realiza mayoritariamente durante los periodos inactivos y de ocio (83,96).

Figura 8. Ejemplo de monitor de frecuencia cardiaca (A), acelerómetro (B) y podómetro (C).

Fuente: <https://www.ozofitness.com/>; <https://actigraphcorp.com/> y <https://www.polar.com/es>



En general, las herramientas de evaluación, tanto indirectas como directas, utilizadas para evaluar AF en la infancia muestran sus propias limitaciones (83,86). El análisis de la literatura actual permite concluir que los acelerómetros (como Actigraph GT3X o ActivPAL) presentan las mejores propiedades psicométricas para la evaluación de la AF (83,86). Por ello, son muy utilizados en estudios de validación de cuestionarios de AF como medida de comparación directa (94). No obstante, en grandes estudios epidemiológicos donde la financiación es limitada y es necesario evaluar a una gran cantidad de participantes, los métodos indirectos pueden ser empleados como fuente de información válida (83,86). El estudio óptimo en el caso de la infancia sería el cual combinase la medida de AF mediante acelerómetro y cuestionarios autorreportados por los progenitores de los niños/as (86).

2.4. Actividad física y longitud del telómero

Como se ha descrito en secciones anteriores, la AF y el ejercicio han sido relacionados con múltiples beneficios para la salud. En el caso de la LT, la AF podría ayudar a su mantenimiento a través de la estimulación de la producción de la telomerasa y la reducción del estrés oxidativo, sosteniendo así la estabilidad genómica (**Figura 9**) (98).

Los posibles mecanismos biológicos que podrían explicar la relación entre AF y LT se han estudiado, en primer lugar, en modelos animales como el ratón (98). En estos animales se ha observado que pequeñas dosis de AF administradas regularmente incrementaban sus niveles de subunidades de la shelterina, como los factores de unión a repeticiones teloméricas 1 y 2 (TRF1 y TRF2) (99). Este incremento se acompañaba de un aumento de la expresión de genes precursores de proteínas encargadas de la reparación del ADN como *Ku80* y *Ku70* (99,100), y la desregulación de aquellas ligadas a la senescencia celular como *p16*, *p53* y *Chk2* (99,100). A su vez, se asoció a correr con una reducción del acortamiento de la LT de hepatocitos y cardiomiocitos (101).

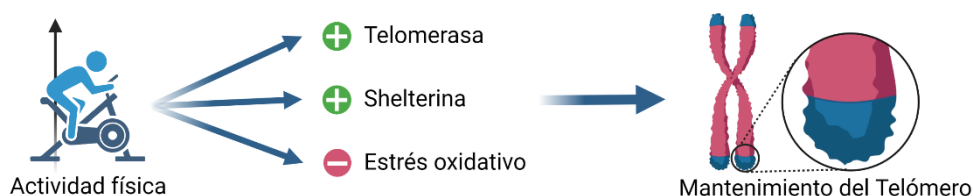
En humanos, fueron Cherkas y colegas en 2008 los primeros investigadores/as que exploraron el efecto de la AF sobre la LT (102). Específicamente, evidenciaron de forma transversal que mayores niveles de AF autorreportada se asociaban con mayor LT leucocitaria en una muestra de 2401 adultos (102). Posteriormente, se realizaron estudios similares en grandes estudios epidemiológicos como el Nurses' Health Study o National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 1999-2002) (103,104). En ambos estudios se observó que aquellos participantes más activos físicamente mostraban una mayor LT (103,104).

A su vez, existe evidencia de que atletas involucrados en pruebas de resistencia física muestran un menor acortamiento de la LT (98,101). Estos atletas presentaban una mayor actividad de la telomerasa y presencia de TRF1. Como sucedía en modelos animales, esta mayor actividad se acompañó de una inhibición de proteínas ligadas a la senescencia y apoptosis celular como *p16*, *p53* y *Chk2* (101). En resumen, la AF afectaría positivamente a la LT a través de la activación de la telomerasa, de las subunidades de la shelterina y la reducción del estrés oxidativo (**Figura 9**) (98). Sin embargo, existen estudios observacionales que no han evidenciado una clara relación entre AF y LT o teorizan que esta relación podría tener forma de U-Invertida (98).

Los estudios anteriormente mencionados son observacionales, ya que el efecto de la AF sobre la LT se ha estudiado poco a nivel experimental. No obstante, existen estudios como el ensayo clínico realizado por Werner y colegas en 2019, donde la aplicación de un protocolo de entrenamiento aeróbico durante 6 meses se asoció con un aumento de la telomerasa y mayor LT en linfocitos, granulocitos y leucocitos (105).

A pesar de estos estudios, las diferentes revisiones sobre LT y AF concluyen que no hay información suficiente para establecer con claridad cuál es la dosis y/o modalidad de AF más beneficiosa para preservar la LT (98,106). Sin embargo, la AFMV de naturaleza aeróbica o la AF vigorosa podrían ser aquellas que más beneficios aporten a la LT (106).

Figura 9. Esquema del potencial efecto de la actividad física sobre la biología de la longitud del telómero. Fuente: Elaboración propia mediante BioRender.com, basado en Schellnegger al., 2022.



Al contrario que en población adulta, la relación entre LT y AF ha sido muy poco explorada en las primeras etapas de la vida. Específicamente, Zhu y colegas fueron los que evidenciaron por primera vez en 2011, que la AF vigorosa medida mediante acelerómetro se asociaba positivamente con la LT en mujeres adolescentes de 14 a 18 años (107). Por otra parte, el estudio experimental de Ojeda-Rodríguez de 2021 identificó que el incremento de 1 MET de AF evaluada mediante acelerómetro se asociaba a un aumento de la ratio de la LT de 26 unidades (108). A su vez, evidenciaron que un aumento de media hora de AFMV se asoció al aumento en una unidad de la ratio de la LT (108). No obstante, este estudio se llevó a cabo en niños/as y adolescentes de 7 a 16 años con obesidad abdominal, no en población general (108). Por último, un estudio longitudinal más reciente (2022) no encontró una asociación entre el tiempo total en AF autorreportado por los progenitores y la LT en niños/as de 3 a 10 años que fueron seguidos entre 5 y 7 años (109).

Biológicamente, el efecto de la AF en la LT durante la infancia se podría entender extrapolando aquellos mecanismos teorizados en población adulta. De hecho, estudios como el de Haapala y colegas han asociado la realización de AFMV con una reducción de biomarcadores sanguíneos de inflamación y, por ende, de estrés oxidativo como leptina, proteína C-reactiva de alta densidad (CRP), glicoproteínas e interleucina-6 (IL-6) (110).

3. Comportamientos sedentarios

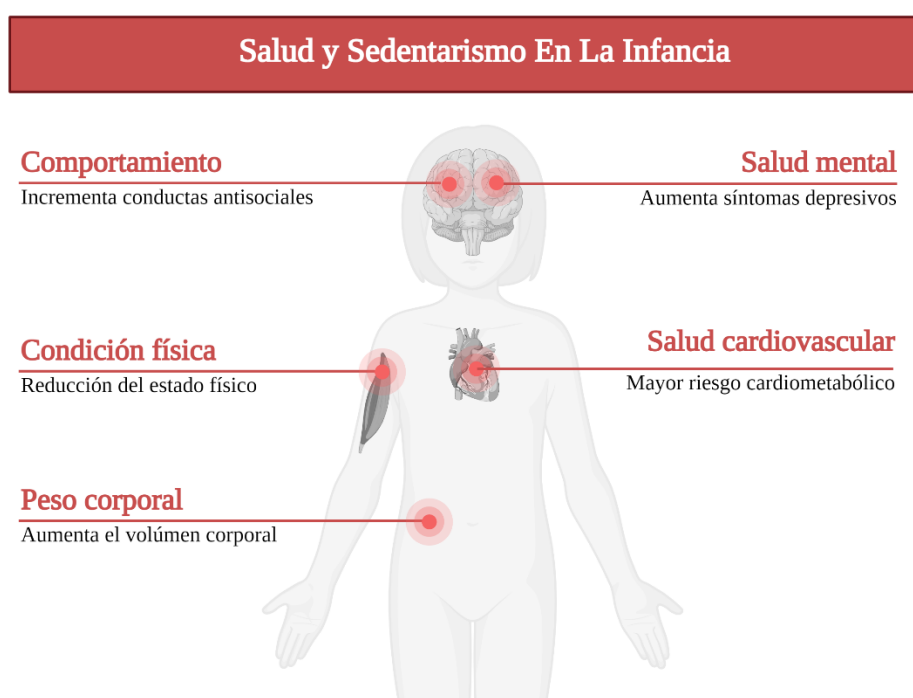
3.1. Comportamientos sedentarios y salud infantil

Según el consenso publicado en 2017 por la Sedentary Behavior Research Network, un comportamiento sedentario (CS) se define como cualquier comportamiento caracterizado por un gasto energético $\leq 1,5$ METs, excluyendo la actividad del sueño (111). Este comportamiento y/o actividad puede tener lugar mientras se está sentado, reclinando o acostado, y en diferentes contextos como el educativo, doméstico, ocio y transporte (111). Como se observa en su definición, no existe un tipo específico de CS, sino que son múltiples las actividades que se

pueden realizar a lo largo del día con un gasto energético $\leq 1,5$ METs. En la actualidad, se ha puesto el foco particularmente en el tiempo de visionado de pantallas (TVP) como potencial medida de estos comportamientos (111).

El TVP puede definirse como el tiempo en actividades basadas en estar frente a una pantalla como jugar con la tableta, el ordenador o ver la televisión en cualquier contexto (111). A pesar de que este tipo de actividades pueden realizarse de forma sedentaria o activa, es más la proporción de personas que las realizan de forma sedentaria (64,111). En este sentido, el tiempo en TVP recreativo, es decir, no relacionado con el trabajo o la escuela, se ha relacionado con la aparición de efectos negativos para la salud en niños/as y adolescentes (**Figura 10**) (61,64,112).

Figura 10. Salud y comportamientos sedentarios en la infancia. Fuente: Elaboración propia mediante BioRender.com, basado en la Physical Activity Guidelines for Americans 2nd edition.



En primer lugar, la evidencia actual indica que los CS podrían estar asociados con un aumento de la adiposidad en población infantil y adolescente (61,64). En particular, un metaanálisis publicado en 2019 mostró que un TVP mayor a dos horas al día se asoció a un mayor riesgo de sobrepeso y obesidad en esta población (113). Estos resultados podrían ser explicados por la acción comportamental que provocan las actividades que involucran TVP. Estas actividades actuarían desplazando aquellas más activas físicamente, reduciendo el gasto energético diario de estos niños/as y favoreciendo así la acumulación de adiposidad (113). Sin embargo, otros estudios de revisión mostraron unos resultados más modestos que indican la necesidad de aumentar la investigación en este campo (114,115).

Por otra parte, un mayor tiempo viendo la televisión se ha asociado a un incremento de factores de riesgo metabólico y de enfermedad cardiovascular como mayor presión sanguínea o concentración de insulina en población infantil y adolescente (64). A su vez, mayor TVP se asoció con una reducción del estado físico (61,64). Se ha teorizado que los CS podrían modificar procesos hemodinámicos, inflamatorios y metabólicos derivando en este impacto negativo, aunque esta relación sigue siendo poco entendida y estudiada por la literatura actual (64).

Los CS también han mostrado tener un posible impacto negativo sobre la salud mental en la infancia y la adolescencia (112). Aunque este tema es emergente, existen estudios que han asociado CS y, en especial TVP recreativo, con menor satisfacción con la vida, baja autoestima, menor felicidad, mayor riesgo de depresión y síntomas de ansiedad en estas etapas de la vida (61,112). Además, mayor tiempo de televisión y jugando a videojuegos se asociaron con conductas antisociales y problemas comportamentales (61). A pesar de que los mecanismos biológicos y psicológicos por los que los CS (o el TVP) afectan a la salud mental de niños/as y adolescentes siguen siendo desconocidos, autoras como Rodríguez-Ayllón han propuesto diversas teorías (112). Primero, los CS se realizan mayoritariamente de forma solitaria, favoreciendo el aislamiento social, los sentimientos de soledad e impactando negativamente en la salud mental (116). En segundo lugar, los mensajes culturales y personales transmitidos por los medios de comunicación y redes sociales podrían causar los problemas comportamentales y de agresividad observados (117). Finalmente, los CS podrían desplazar otras actividades sociales e incluso disminuir la duración del sueño, elemento crucial para un correcto desarrollo cognitivo y emocional (118,119). De hecho, un mayor TVP se ha asociado con un tiempo de sueño más corto en esta población (119).

Los potenciales efectos negativos de los CS anteriormente descritos han provocado que diversas agencias de salud pública recomienden reducir al máximo posible la realización de estos comportamientos durante la infancia y la adolescencia (61).

3.2. Recomendaciones y epidemiología actual

A consecuencia de los emergentes estudios sobre el impacto negativo de los CS en la salud humana, diversas instituciones de salud pública como la American Academy of Pediatrics o la Canadian Society for Exercise Physiology establecieron sus recomendaciones para limitar el tiempo en CS durante la infancia y adolescencia en los años 2001 y 2011, respectivamente (120,121). Ambas instituciones indicaron que los jóvenes debían restringir de forma prioritaria el tiempo en CS y aumentar su AF. Específicamente, establecieron limitar el TVP a no más de 2 horas al día (120,121).

Respecto a la OMS, las recomendaciones dirigidas a los CS no se incluyeron en la guía publicada en 2010 (122). Sin embargo, estas fueron descritas en la guía de 2020 debido al aumento

de la evidencia sobre el efecto negativo de los CS en la infancia y adolescencia (61). La OMS indica que el auge de la tecnología y las redes digitales han influido en la forma de estudiar, viajar, comunicarse y divertirse de los jóvenes, aumentando cada vez más el tiempo en CS (61). Por ello, la OMS recomienda limitar la cantidad de tiempo en CS y, en particular, el TVP recreativo (**Figura 11**) (61).

Esta recomendación basada en la limitación general y no cuantificada se debe a que actualmente no contamos con suficiente evidencia para determinar de forma precisa una relación dosis-respuesta entre CS (o TVP) y los resultados en salud (61). Sin embargo, se puede concluir que los beneficios de limitar la cantidad de tiempo en CS en niños/as y adolescentes superan a los posibles efectos dañinos de esta recomendación (61).

Figura 11. Recomendación sobre la limitación de actividades sedentarias en la infancia y adolescencia (5-17 años) según la Organización Mundial de la Salud. Fuente: WHO Guidelines on Physical Activity and Sedentary Behavior 2020.



En Europa, el aumento de la evidencia sobre el posible efecto negativo de los CS y la aparición de las recomendaciones anteriormente nombradas en otros países desembocó en la preocupación sobre si los niños/as y/o adolescentes europeos cumplían, o no, con estas recomendaciones (123).

Preocupantemente, la evidencia indica que la población joven en Europa parece no cumplir con las recomendaciones establecidas con el TVP, especialmente los fines de semana y con la limitación general de CS (123). Ya en 2014, Santaliestra-Pasías y colegas publicaron un artículo donde analizaron el TVP reportado por los progenitores de 15330 niños/as, pertenecientes a 8 países europeos del estudio IDEFICS (Identification and prevention of dietary- and lifestyle-induced health effects in children and infants) (123). En este estudio se identificó que el 43% de los niños y el 31% de las niñas entre 6 y 10 años presentaban una media de TVP al día mayor a 2 horas (123). Los resultados de esta publicación se pudieron confirmar el mismo año cuando Konstabel y colaboradores exploraron el tiempo en CS en el mismo estudio IDEFICS, pero

medido de forma directa utilizando acelerómetros (124). En este estudio se analizaron 7684 niños/as de 2 a 10 años y se evidenció que la media de horas al día en CS era igual o superior a 4, tanto en niños como en niñas y para todas las categorías de edad analizadas (124).

En 2021, López-Fernández y colegas volvieron a poner énfasis en el exceso de CS en adolescentes europeos (125). En particular, analizaron a 2542 adolescentes de 15 a 17 años procedentes de 28 países europeos, en cuatro años distintos (2002, 2005, 2013, y 2017). Los CS fueron evaluados con la versión corta del Physical Activity Questionnaire (IPAQ) y establecieron ≥ 4 horas y 30 minutos de tiempo en sedestación como exceso de CS (125). La prevalencia de exceso de CS entre los adolescentes europeos fue de entre 74,2% y 76,8% en función del país de origen (125).

En el caso específico de España, un estudio de 2017 exploró el TVP en una muestra representativa de 424 niños/as y adolescentes (126). El tiempo total en actividades que involucran TVP se analizó con el cuestionario del estudio HELENA. En este estudio se observó que el 49% de los participantes entre semana y el 84% los fines de semana presentaban un TVP medio de ≥ 2 horas al día (126).

De acuerdo con la evidencia disponible hasta el momento, se puede concluir que los niños/as europeos/as parecen no cumplir con las recomendaciones de limitar su tiempo en CS, lo que muestra un importante problema de salud pública. Además, esta problemática puede ser agravada por el hecho de que lo/as niños/as más inactivo/as tienden a serlo durante la adolescencia y adultez (80). Por ello, es evidente que son necesarias más acciones de intervención e investigación desde la salud pública para alcanzar a disminuir la prevalencia de niños/as y adolescentes europeos físicamente inactivos.

3.3. Evaluación de los comportamientos sedentarios

La evaluación de los CS en la infancia y adolescencia en estudios epidemiológicos es comúnmente realizada utilizando herramientas similares a las descritas en la sección de AF. No obstante, podemos apreciar algunas diferencias:

a) Cuestionarios y diarios

Los cuestionarios y diarios son métodos de bajo coste y fáciles de administrar para evaluar variables como los CS en grandes estudios epidemiológicos (82). Además, presentan la ventaja de poder recopilar información relativa al tipo y contexto del CS (127). Esta opción de evaluación es la más popular en la literatura, representando según una revisión el 80% de los métodos de evaluación de CS utilizados en estudios científicos (128). Sin embargo, al igual que sucede con la evaluación de la AF, estos cuestionarios están sujetos a sesgos de memoria (84,85). Además, los niños/as menores a 10 años no son muy precisos en reportar sus patrones físicos diarios (129).

Por ello, en estas edades son realmente los progenitores o profesores los que cumplimentan estos instrumentos. Mediante este *proxy*, se puede evitar el sesgo de memoria producido por la inmadurez cognitiva de los niños/as. Sin embargo, es posible que los progenitores puedan cometer errores al no conocer exactamente la rutina física de su hijo/a (129).

En la actualidad existen diversos cuestionarios que han sido desarrollados para evaluar CS en la infancia y la adolescencia (127). Algunos como el CLASS (88) evalúan CS de forma general (minutos/día), mientras que otros como el cuestionario utilizado en el estudio HELENA recoge el tiempo en diferentes CS (88,130). No obstante, la literatura indica que la validez de estos cuestionarios es moderada y la mejor estrategia es combinarlo con métodos directos (86).

b) Acelerómetros e inclinómetros

Los acelerómetros han sido identificados por la literatura como herramientas válidas y fiables para la evaluación del tiempo en CS en población infantil y adolescente (131). Sin embargo, en el caso específico de los CS, los acelerómetros no pueden identificar su tipo y contexto (129). Además, presentan dificultades para diferenciar entre estar de pie de forma inactiva y sentado (129). Por ello, diversos acelerómetros modernos como ActiGraph GT3X o activPAL han incluido un inclinómetro para poder detectar de forma más fiable la postura de la persona y distinguir entre estar de pie de forma inactiva, sentado o tumbado (132).

c) Monitores de frecuencia cardiaca

Dado que los monitores de frecuencia cardiaca no tienen la capacidad de diferenciar posturas, se desarrollaron instrumentos como Actiheart que unen un acelerómetro/inclinómetro y estos monitores (132). Esto permite tanto detectar los períodos inactivos mediante el acelerómetro/inclinómetro y determinar su gasto energético basado en la frecuencia cardiaca (132). Debido a esta unión, este monitor podría diferenciar entre CS y AF en sedestación en función del gasto energético. Sin embargo, tanto el uso de estos monitores unidos o separados han mostrado poca validez para medir CS (127).

3.4. Comportamientos sedentarios y longitud del telómero

Pese a la creciente evidencia sobre el potencial efecto negativo de los CS sobre la salud humana, pocos son los estudios que han explorado los posibles mecanismos biológicos y fisiológicos que ocasionan esta relación. En el caso de la asociación entre LT y CS, la evidencia es todavía incipiente. Sin embargo, podemos destacar algunos estudios previos.

En población adulta, un primer estudio publicado por Loprinzi y colegas en 2015 identificó de forma transversal que cada hora al día en TVP aumentaba un 7% el riesgo de presentar una LT en el tercil más bajo (133). Este estudio se realizó en una muestra de 6405 adultos del estudio NHANES (133). Sin embargo, en 2017, otra publicación realizó un análisis

similar evaluando CS, AF y AF aeróbica en 1868 adultos de este mismo NHANES, no encontrando una asociación estadísticamente significativa entre TVP y LT (134). Por último, Xue y colegas (2017) exploraron la asociación entre ver la televisión y LT en 518 adultos de 20 a 70 años (135). Los resultados mostraron que cada hora al día de visionado de televisión se asociaba a una disminución de la LT de 72 bp (135). Además, en este mismo estudio se identificó que los adultos entre 20-40 años situados en el tercil más alto de visionado de televisión (media de 3 horas/día) presentaban una LT 3,9% menor, en comparación con el tercil más bajo (media de 0,4 horas/día) (135). Aunque los mecanismos por el cual los CS podrían afectar a la LT a nivel celular no han sido todavía esclarecidos, diversas teorías apuntan a un posible desbalance de la respuesta antiinflamatoria y del estrés oxidativo (**Figura 12**) (106,136).

Figura 12. Esquema del potencial efecto de los comportamientos sedentarios sobre la biología de la longitud del telómero. Fuente: Elaboración propia mediante BioRender.com, basado en Schellnegger al., 2022.



De acuerdo con diversa evidencia científica, a nivel fisiológico, un aumento de los CS podría causar respuestas inflamatorias y un aumento de la presencia de CRP e IL-6, derivando en más ROS y pérdida de LT (106,136). Además, los CS están asociados a un aumento de adiposidad, la cual genera procesos de inflamación crónica y la formación de IL-6 (11,106,136).

En el caso de la infancia y adolescencia el volumen de evidencia es muy escaso. En particular, encontramos el estudio experimental de Ojeda-Rodríguez publicado en 2021 con 102 niños/as españoles de 7-16 años, el cual identificó que una reducción de los CS evaluada mediante acelerómetro se asociaba positivamente con la LT (108). Basándonos en lo observado en literatura previa, podemos teorizar que los CS en estas etapas tempranas de la vida aumentan la concentración en sangre de factores inflamatorios e incrementan la inflamación crónica. En este sentido, Haapala y colegas (2021) observaron una asociación entre los CS y el aumento de biomarcadores inflamatorios como CRP, leptina e IL-6 en niños/as de 6-8 años (110). Además, un mayor tiempo de visionado de televisión en niños/as de 7-10 años se ha asociado con mayores niveles de CRP y de la molécula de adhesión celular vascular 1, un marcador de disfunción endotelial (137). Por ello, a falta de una mayor investigación y confirmación de resultado, podemos concluir que los CS podrían incrementar la inflamación, el estrés oxidativo en la infancia y, por tanto, inducir apoptosis y senescencia celular disminuyendo así la LT.

JUSTIFICACIÓN

El estudio de la asociación entre estilos de vida potencialmente modificables y biomarcadores de envejecimiento como la LT ha crecido de forma exponencial durante las últimas décadas. Hasta el momento, se ha identificado que la LT es sensible a factores como la dieta o la exposición al tabaco durante la infancia y adolescencia. Sin embargo, pese al potencial efecto beneficioso de la AF y negativo de los CS en esta población, son limitados los estudios sobre la asociación entre estos dos factores y la LT durante la infancia. Además, estos estudios son mayoritariamente de corte transversal. En este sentido, la importancia del estudio de esta relación radica en que el acortamiento de la LT es más pronunciado durante las primeras etapas de la vida, debido al aumento de la replicación celular (138). Por ello, la presencia de estilos de vida potencialmente modificables como la AF y los CS podrían condicionar el envejecimiento celular desde la infancia hasta la adultez.

En consideración a lo anteriormente expuesto, existe la necesidad de realizar esta tesis doctoral con el objetivo de aportar nuevos datos que exploren el impacto de la AF y los CS sobre la LT. De esta forma, se evidenciaría la posible relación entre estilos de vida potencialmente modificables y biomarcadores de envejecimiento, ya durante la infancia. Este hecho serviría para atraer el foco de las instituciones y de la población general sobre el cumplimiento de las recomendaciones de AF y CS durante las primeras etapas de la vida. Por consiguiente, se considera como justificada la necesidad de este trabajo.

HIPÓTESIS

Las hipótesis planteadas que hemos tratado de verificar en esta tesis doctoral se encuentran estrechamente relacionadas con los objetivos planteados. Estas hipótesis son las siguientes:

- a) Los/as niños/as que realizan más AF diaria extracurricular (AFE) presentan una mayor LT a los 4 años, así como entre los 4 y 8 años.

- b) Los/as niños/as que dedican más horas al día en CS presentan una menor LT a los 4 años, así como entre los 4 y 8 años. (*publicación I*).

Paralelamente, planteamos una última hipótesis conceptual referente al instrumento de medición empleado para la medición de la AF en otras etapas de la infancia. Por tanto, también verificamos la siguiente hipótesis:

- c) La información sobre AFMV reportada por los padres en niños/as en edad escolar de 6 a 12 años usando el cuestionario CLASS es válida (*publicación II*).

OBJETIVOS

En función de las hipótesis planteadas en esta tesis doctoral, se propone el siguiente objetivo general:

- Explorar la asociación entre AFE y los CS en la LT a los 4 años y entre los 4 y los 8 años en el proyecto TeloDiPA, con niños/as pertenecientes al estudio Infancia y Medio Ambiente (INMA).

A su vez, este objetivo general se acompaña de dos objetivos específicos, los cuales representan los principales resultados obtenidos e investigaciones desarrolladas en este trabajo:

- a) Explorar la asociación entre mayores niveles de AFE y la LT de niños/as a los 4 años y entre los 4 y 8 años.
- b) Explorar la asociación entre los CS y la LT de niños/as a los 4 años y en el intervalo entre los 4 y 8 años (*publicación I*).

Por último, y con el fin de establecer un punto de partida para realizar futuras investigaciones sobre la relación entre la AF y la LT en la infancia, se planteó el tercer objetivo de esta tesis doctoral:

- c) Evaluar la validez de la información de AF recogida mediante un cuestionario reportado por los padres en niños/as de 6 a 12 años pertenecientes al estudio INMA y Human Early Life Exposome (HELIX) mediante acelerometría (*publicación II*).

METODOLOGÍA

1. Diseño y población de estudio

La presente tesis doctoral utiliza datos pertenecientes al proyecto INMA (<https://www.proyectoinma.org/>), un estudio epidemiológico de cohortes de nacimiento prospectivo y multicéntrico que se desarrolla en España desde 1997. El principal objetivo de este proyecto es describir y evaluar el impacto de los factores de exposición prenatales, perinatales y durante la infancia en el crecimiento, desarrollo y salud fetal y de los niños/as (139).

El proyecto INMA se compone de 7 cohortes, tres de ellas creadas en 1997 (Granada, Menorca y Ribera de l'Ebre) y cuatro de nueva creación que siguen un protocolo común (Asturias, Guipúzcoa, Sabadell y Valencia) y que constituyeron la configuración definitiva del proyecto en 2003 (**Figura 13**).

Figura 13. Localización geopolítica de las cohortes participantes en el proyecto Infancia y Medio Ambiente. Fuente: <https://www.proyectoinma.org/>



De forma específica, este trabajo ha utilizado datos de las cohortes INMA Asturias, Guipúzcoa y Sabadell. El reclutamiento en estas cohortes tuvo lugar durante la primera visita prenatal (10-13 semanas de gestación) en el principal hospital público o centro de salud de cada área de estudio. Las participantes de Asturias fueron reclutadas de mayo de 2004 a junio de 2007. En el caso de Guipúzcoa, este reclutamiento se realizó de abril de 2006 a enero de 2008. Por último, desde julio de 2004 hasta julio 2006 tuvo lugar el reclutamiento en Sabadell. Las madres fueron integradas en el proyecto si cumplían los siguientes criterios de inclusión (139):

- a) Residente en el área de estudio
- b) Mínimo 16 años de edad
- c) Embarazo único
- d) Realizar la primera visita prenatal en el hospital público o centro de salud de referencia del área de estudio
- e) No haber realizado un programa de reproducción asistida
- f) Dar a luz en el hospital o centro de salud de referencia
- g) No presentar problemas de comunicación

En total, 1909 madres fueron reclutadas en estas tres áreas de España. De estas madres, 1383 (72,4%) y sus hijos/as fueron evaluados en la visita de seguimiento a los 4 años. La principal variable de esta tesis doctoral, la LT, fue media en 784 niños/as a los 4 años (Asturias = 298; Guipúzcoa = 145 y Sabadell = 341). En el seguimiento sucesivo, 610 niños/as (Asturias = 204, Guipúzcoa = 134, a los 7 años; y Sabadell= 272, a los 9 años) presentaban medidas repetidas de la LT. De ahora en adelante, a esta visita se la referirá como “8 años”. Los datos de ambas muestras (4 y 8 años) se emplearon para llevar a cabo el primero y el segundo de los objetivos específicos propuestos en este trabajo.

Para responder al tercer objetivo específico, se utilizaron los datos de 230 niños/as que presentaban medición directa de AF mediante acelerómetro de las cohortes de INMA Guipúzcoa (n = 136, 10-12 años) y de tres cohortes del proyecto The Human Early-Life Exposome (HELIX, <http://www.projecthelix.eu/es>): HELIX-Sabadell (n = 37, 9 años), HELIX-Born in Bradford (BiB, n = 27, 6 años) y HELIX-Étude des Déterminants pré et postnatals du développement et de la santé de l’Enfant (EDEN, n = 30, 11 años). Al igual que INMA, HELIX es un proyecto colaborativo de cohortes de nacimiento prospectivo y multicéntrico a nivel europeo (140). El proyecto HELIX tiene como objetivo general medir y describir exposiciones ambientales múltiples de los diferentes dominios del “exposoma” durante la vida temprana (embarazo y niñez) y asociarlos con marcadores ómicos y resultados de salud infantil (140). HELIX cuenta con 6 cohortes: INMA-Sabadell (España), BiB (Inglaterra), EDEN (Francia), MoBa (Noruega), KANC (Lituania) y Rhea (Grecia). El reclutamiento en estas cohortes tuvo lugar entre 2007-2010 y 2003-2006, respectivamente (140).

2. Aspectos éticos

La presente tesis doctoral ha recibido un informe de investigación responsable positivo por el Comité de Ética e Integridad en la Investigación de la Universidad Miguel Hernández de Elche (ADH.SPU.ENM.DPB.23, *Anexo 3*). A su vez, el proyecto “Dieta y actividad física en embarazo y tras el nacimiento y longitud del telómero en niños/as y adolescentes: Estudio TeloDipa”, en el que se enmarca este trabajo, ha obtenido una evaluación ética favorable por el

Órgano Evaluador de Proyectos de esta misma universidad (DSP.ENM.01.18) y por el Comité de Ética para la Investigación con Medicamentos del Departamento de Salud de Alicante (PI2019/072). En lo referente a los proyectos INMA y HELIX, todas las cohortes involucradas obtuvieron informes favorables de los comités de ética de origen. Además, los participantes fueron informados correctamente y firmaron un consentimiento informado.

Este trabajo se llevó a cabo de acuerdo con los principios éticos establecidos por la declaración de Helsinki (141) y la Ley Orgánica 3/2018 de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales. La información necesaria para realizar la presente tesis doctoral fue preparada por un encargado del tratamiento de datos externo y se recibieron en bases de datos anonimizadas.

3. Variables de estudio

3.1. Longitud del telómero leucocitario

Las muestras de sangre de los niños/as fueron recogidas durante las visitas de seguimiento y conservadas en tubos con ácido etilendiaminotetraacético. El ADN necesario para la evaluación de la LT fue extraído a los 4 años en sangre total con el kit Qiagen Flexigen AGKT-WB-640 en las muestras de Guipúzcoa, Perkin Elmer Chemagen kit en Sabadell y desde muestras de capa leucocitaria con Qiagen QIAamp DNA Mini Kit en Asturias. A los 8 años, el ADN fue extraído en muestras de capa leucocitaria utilizando los kits anteriormente descritos (**Tabla 2**).

Tabla 2. Resumen de las muestras y kits de extracción de ADN utilizados.

Cohorte	Muestra 4 años	Muestra 8 años	Kit de extracción de ADN
Asturias	Capa leucocitaria	Capa leucocitaria	Qiagen QIAamp DNA Mini Kit
Guipúzcoa	Sangre total	Capa leucocitaria	Qiagen Flexigen AGKT-WB-640
Sabadell	Sangre total	Capa leucocitaria	Perkin Elmer Chemagen kit

La LT leucocitaria relativa fue obtenida mediante un protocolo de qPCR creado originalmente por Cawthon en 2009 (15) y modificado por Martens y colegas (142). En primer lugar, la cantidad y pureza del ADN fue evaluada mediante un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Isogen, Life Science, Bélgica). En concreto, se consideró al ADN como puro cuando la absorbancia en la longitud de onda A260/280 fue mayor que 1,8 y mayor a 2,0 en A260/230. Posteriormente, la integridad del ADN se exploró mediante electroforesis en agarosa. En cada qPCR se utilizó una dilución de 5ng de ADN verificada mediante el kit Quant-iT PicoGreen dsDNA (Life Technologies, Europa). Todas las muestras fueron evaluadas por triplicado

utilizando el Sistema Rápido de PCR a Tiempo Real 7900HT (Applied Biosystems) en un formato de placa de 384 pocillos.

La mezcla de reacción del T contenía 1x QuantiTect SYBR Green PCR máster mix (Qiagen, Inc., Venlo, Países Bajos), 2 mM dithiothreitol, 300 nM de primer telg (ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGT TAGTGT) y 900 nM de primer telc (TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACA). Las condiciones aplicadas en la qPCR fueron: 1 ciclo a 95°C de 10 minutos, 2 ciclos a 94° de 15 segundos, 2 ciclos a 49°C de 2 minutos y 30 ciclos a 94°C de 15 segundos, a 62°C de 20 segundos y a 74°C de 1 minuto y cuarenta segundos. Respecto al S (β globina humana), la reacción contuvo 1x QuantiTect SYBR Green PCR máster mix, 400 nM de primer HBG1 (GCTTCTGACACAACACTGTGTTCCTACTAGC) y 400 nM de primer HBG2 (CACCAACTTCATCCACGTTACC). Las condiciones aplicadas fueron: 1 ciclo a 95°C de 10 minutos y 40 ciclos a 95°C de 15 segundos y a 58°C de 1 minuto y 20 segundos.

Respecto a las muestras de Sabadell a los 8 años, éstas fueron medidas utilizando un protocolo ligeramente diferente de qPCR (143). Específicamente, la mezcla de reacción del S contuvo 1x QuantiTect SYBR Green PCR máster mix, 300 nM de primer 36B4u (CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC) y 500 nM de 36B4d (CCATTCTATCATCAACGG GTACAA). Las condiciones aplicadas en la qPCR fueron las mismas reportadas para las otras cohortes.

Tras cada serie de qPCR se realizó una dilución en 6 puntos de ADN (n= 12 muestras) para evaluar la eficiencia del T y S. En este caso, la eficiencia fue del 107% para T (el R^2 osciló entre 0,995 y 0,999). Además, tras cada serie se inspeccionó visualmente las diferentes curvas individuales de qPCR y de disociación. Cuando se observó un error, el valor del ciclo de cuantificación (Cq) fue eliminado para realizar los análisis. Asimismo, cuando los triplicados mostraban una desviación de más de 0,3 Cq, las muestras fueron eliminadas. En total, 6 muestras no cumplieron con estos criterios.

La LT leucocitaria relativa se calculó de forma separada para cada cohorte como una cantidad relativa normalizada y calibrada utilizando el software qBase (Biogazelle, Zwijnaarde, Bélgica) (144). Debido a que la elección de la muestra de calibración es crucial ya que influencia el error de la cuantificación final, la normalización se realizó empleando los valores de cuantificación medios aritméticos de todas las muestras analizadas por cohorte.

Finalmente, debemos considerar que las muestras en cada cohorte fueron evaluadas en múltiples placas de qPCR. Por ello, se realizaron 8 calibraciones inter-serie (CIS) para calcular la corrección dirigida a minimizar las diferencias entre series (144). En cada serie, la fiabilidad y precisión del protocolo fue explorada calculando el coeficiente de correlación intraclase (CCI)

entre las muestras por triplicado. Este ICC fue calculado para T (0,957; 95% CI: 0,954–0,96; $p < 0,0001$), S (0,968; 95% CI: 0,965–0,97; $p < 0,0001$) y el T/S ratio (0,925; 95% CI: 0,918–0,93; $p < 0,0001$) utilizando la sintaxis de R provista por el Telomere Research Network (145). Finalmente, se calculó el ICC inter-serie en base a las 8 CIS realizadas (0,898; 95% CI: 0,77–0,948; $p < 0,0001$).

3.2. Actividad física

Para responder al primer objetivo de esta tesis doctoral se utilizaron datos de AF reportada por los progenitores de los niños/as a los 4 años. Durante la visita de seguimiento correspondiente, se les preguntó a los progenitores cuánto tiempo (en horas y minutos) realizaba su hijo/a AF extracurricular (AFE) estructurada (natación, clases de baile, etc.) o no estructurada (correr, saltar, jugar en el parque, etc.) cada día. Se utilizó esta información para calcular la media de gasto energético diario (METs x hora/día) en AFE. Para ello, primero se le asignó un valor MET a cada actividad y/o deporte reportado en base a publicaciones previas (146). Tras esto, se multiplicó el número de horas de AFE reportadas por la mediana de los METs de todas aquellas actividades practicadas ese día. Los METs x hora/día fueron obtenidos sumando los gastos energéticos de todos los días y dividiéndolos entre 7. Finalmente, esta variable fue transformada en terciles con el objetivo de clasificar a los niños/as en un nivel bajo, medio o alto de gasto energético diario en AFE.

En el caso del objetivo tres, se emplearon datos de AF reportada por los progenitores y recogida de forma directa mediante acelerometría. En el caso de la AF reportada por los progenitores, se utilizó un cuestionario basado en el CLASS (88). En este cuestionario se preguntaba: *Durante una semana típica, ¿realiza su hijo/a alguna de las siguientes actividades programadas durante el horario escolar?* y *Pensando en el resto del año, ¿realiza su hijo/a alguna de las siguientes actividades físicas (incluyendo actividad programada o simplemente juego normal) fuera del horario escolar?* Estas preguntas se acompañaban de una lista con diferentes actividades (ej. correr, tenis, natación, etc.) y una pregunta sobre el tiempo y la frecuencia de realización de la actividad seleccionada. A cada una de las actividades y/o deportes se le asignó un MET (146,147) y la media de minutos/día en AFMV se calculó como la suma de todos los minutos en AFMV al día divididos entre 7.

La AFMV evaluada con el cuestionario fue comparada usando un acelerómetro ActiGraph wGT3X-BT (Pensacola, EEUU), en el caso de HELIX, y un acelerómetro Activinsights GeneActiv (Kimbolton, Inglaterra), en INMA-Guipúzcoa. Los acelerómetros fueron llevados por los niños/as durante la misma semana a la que se refirió el cuestionario.

En el caso de ActiGraph, este fue llevado por los niños/as a la derecha de la cadera solo durante el día (entre las 6:00 y las 23:59). La aceleración fue recopilada a 30 Hz. Tras la recogida

de información, los datos fueron descargados en *epoch* de 10 segundos mediante el software ActiLife. Los METs para cada *epoch* se calcularon utilizando las indicaciones establecidas por Crouter y colegas (148). Los periodos en los que el acelerómetro no se llevase puesto se registraron definiendo un punto de corte de ≥ 20 minutos sin registro (149,150). Además, se estableció como criterio de inclusión que los niños/as llevaran el acelerómetro un mínimo de 10 horas al día durante al menos 3 días (151). Los minutos medios diarios de AFMV se calcularon como la suma de los minutos de AFMV detectados por el acelerómetro entre el número de días válidos (152).

Respecto al acelerómetro GeneActiv, los niño/as lo llevaron en la muñeca no dominante en un régimen de 24 horas. La aceleración fue recopilada a 85,7 HZ. Tras la aplicación del protocolo de recogida, los datos fueron descargados en CSV mediante el software GENEActiv. El procesamiento de estos datos se realizó mediante el paquete GGIR de R versión 2.4 (95). La intensidad de la AF fue calculada utilizando los puntos de cortes publicados por Hildebrand y colegas: moderada–vigorosa= 695,8 mg (153,154). Estos puntos de corte se diseñaron para ser equivalentes con los METs. Los periodos de 15 minutos de no registro se definieron como tiempo en el cual el niño/a no llevaba puesto el acelerómetro (155). Finalmente, los criterios de inclusión y el cálculo de la variable de AFMV se realizó de la misma forma que en los datos de ActiGraph.

3.3. Comportamientos sedentarios

El segundo objetivo específico se exploró utilizando el tiempo en CS de niños/as a los 4 años reportado por los progenitores. Esta variable fue obtenida mediante un cuestionario basado en el CLASS (88). En concreto, se preguntó a los progenitores cuántas horas pasaba su hijo/a viendo la televisión/vídeos (TVP) o realizando otros CS (puzles, leer, deberes, etc.) entre semana y los fines de semana fuera del colegio. La media de horas diarias en TVP y en otros CS fue calculada de la siguiente forma: $((\text{Tiempo entre semana} \times 5) + (\text{Tiempo en fin de semana} \times 2))/7$. A su vez, se calculó la media diaria de horas en CS totales sumando ambas variables. Finalmente, las tres variables creadas (TVP, otros CS y tiempo total en CS) fueron transformadas en terciles con el objetivo de clasificar a los niños/as en un nivel bajo, medio o alto de CS.

3.4. Covariables de estudio

En las publicaciones de esta tesis doctoral se han tenido en cuenta diversas covariables sociodemográficas, antropomórficas y de estilos de vida que fueron estudiadas como potenciales factores de confusión:

AFE y *LT*- Se incluyeron covariables recogidas durante el embarazo o al nacimiento como el sexo del niño/a, parto pretérmino (sí, no), índice de masa corporal periconcepcional de la madre (IMC, calculada como kg/m^2), país de origen (España, otros) y el nivel educativo de la madre (primaria, secundaria o universidad). Además, se tuvieron en cuenta covariables reportadas

durante la visita de seguimiento a los 4 años. Específicamente, en el caso de los niños se incluyó su edad (años), IMC (kg/m^2), fecha de extracción de la muestra sanguínea, estación de la extracción, consumo total de energía ($\text{kcal}/\text{día}$) (156), consumo de alimentos ultraprocesados de acuerdo con la clasificación NOVA ($\text{g}/\text{día}$) (157), adherencia a la dieta Mediterránea medida por el relative Mediterranean Score (rMED) (158), horas de TVP (horas/semana) y duración del sueño (horas/semana). Respecto a las madres, estas variables fueron: edad (años) y fumar (sí, no) en la visita de los 4 años. Por último, se calculó el tiempo (años) entre el seguimiento a los 4 y 8 años.

Publicación I- Se emplearon las covariables exploradas en la anterior publicación. No obstante, se añadió adicionalmente la variable METs hora/día en AFE a los 4 años y no se incluyó información relativa al sueño a los 4 años.

Publicación II- Las siguientes covariables recogidas en los proyectos HELIX e INMA fueron consideradas en este estudio: edad (años), sexo, IMC (kg/m^2), grupos de IMC (sobrepeso/obesidad o normopeso) según los puntos de corte específicos de la OMS (159), edad de la madre (años) y nivel socioeconómico (bajo, medio, alto).

4. Análisis estadístico

Los diferentes análisis estadísticos realizados en esta tesis doctoral se llevaron a cabo mediante el software R (R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <http://www.Rproject.org>). Las pruebas estadísticas empleadas fueron bilaterales y el nivel de significación se estableció en 0,05.

En cada una de las publicaciones de esta tesis doctoral se han descrito las principales variables sociodemográficas, de salud y estilos de vida de los participantes. En primer lugar, se evaluó la normalidad de las variables cuantitativas mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lillifors. En el caso de que las variables siguiesen una distribución normal, estas se describieron mediante media y desviación estándar (DE). En el caso de que siguieran una distribución distinta de la normal, se usó mediana y rango intercuartílico (RI). Respecto a las variables cualitativas, se describieron según su frecuencia absoluta (n) y porcentaje (%). Además, se realizaron análisis bivariantes mediante las pruebas Chi-cuadrado, Kruskal-Wallis y/o ANOVA para evaluar las diferentes características en función de terciles de tiempo total en CS (*publicación I*) y cohorte de estudio (*publicación II*).

Para realizar el análisis entre AFE/CS y la LT entre los 4 y 8 años se usaron modelos de regresión robusta múltiple. Sin embargo, y como se ha indicado anteriormente, la LT de los niños/as de Sabadell a los 8 años se realizó utilizando un protocolo ligeramente diferente de qPCR y, por lo que no podían ser directamente comparables con aquellas mediciones a los 4 años. Por ello, se usó el ranking de la LT entre los 4 y 8 años para explorar estas asociaciones (160). En primer lugar, se estableció el ranking de la LT a los 4 y 8 años por cohorte, ordenando los datos

de la longitud más larga a la más corta (codificado desde 1 a n). Tras realizar esto, se calculó la diferencia en el ranking de la LT (ΔR) para cada niño/a mediante la siguiente fórmula:

$$\Delta R = \frac{(R_1 - R_2)}{\left(\frac{n - 1}{100}\right)}$$

En esta fórmula la n representa el tamaño muestral, R_1 es el ranking a los 4 años y R_2 el ranking a los 8 años. Debido a que la diferencia en el ranking de la LT está determinada por el tamaño muestral, ésta se transformó en base 100 para facilitar la interpretación a nivel porcentual (160). Las estimaciones finales obtenidas se interpretan en % de cambio en el ranking de la LT, donde un valor negativo indicaría una mayor aceleración del acortamiento de la LT entre los 4 y 8 años. En ambos casos en los que se empleó este análisis (AFE y CS), se realizó un modelo complementario ajustando por el tiempo de seguimiento y la LT a los 4 años.

Por otra parte, la asociación transversal entre AFE/CS y LT a los 4 años se exploró mediante modelos de regresión lineal robusta múltiple mediante el paquete *robustbase* (161). En este caso, la LT fue transformada en logaritmo en base 10 y las estimaciones obtenidas interpretadas en % de cambio en la LT. Estos modelos fueron ajustados por aquellas covariables que mostraron un $p < 0,2$ en el análisis bivariante y que ocasionaron un cambio en la magnitud del efecto principal del 10% tras su exclusión u inclusión en el modelo (162).

Adicionalmente, en los análisis de AFE/CS y LT se realizaron análisis de sensibilidad para estudiar la robustez de los hallazgos. En el caso de la AFE, se examinó el efecto de incluir al modelo principal diferentes variables de lo/as niños/as (rMED, duración del sueño y prematuro) y sus madres (IMC periconcepcional y hábito tabáquico en la visita de los 4 años). Por su parte, en el caso de los CS se exploró el efecto de la inclusión en el modelo principal de variables del niño/a como el rMED, IMC, estación de la extracción sanguínea, AFE, y de la madre como su IMC periconcepcional, hábito tabáquico en la visita de los 4 años y nivel educativo. Además, se exploró el efecto de acuerdo con el sexo del niño/a y excluyendo aquello/as con nacimiento prematuro.

En el caso de los análisis realizados en la segunda publicación, se calculó la diferencia media entre la AFMV (minutos/día) reportada por los progenitores (cuestionario) y la detectada por el acelerómetro. Esta diferencia fue representada en un gráfico de Bland-Altman (163). Se exploraron las posibles covariables asociadas a esta diferencia mediante modelos de regresión lineal robusta múltiple. En segundo lugar, la validez concurrente entre la medida directa e indirecta de AFMV se evaluó mediante correlaciones parciales de Spearman ajustadas por cohorte. Para ello, se utilizó el paquete *ppcor* de R (164). Se exploró la robustez de esta correlación mediante diferentes análisis de sensibilidad. En particular, se observó el efecto de variables del niño/a como el sexo, edad e IMC, y de variables de la madre como la edad y el nivel

socioeconómico. Por último, se evaluó la capacidad del cuestionario para clasificar niños/as físicamente activos según las recomendaciones de la OMS (al menos 60 minutos/día de AFMV) (61). Esto se realizó mediante el estudio de la curva ROC estratificada por sexo del niño/a mediante el paquete *pROC* (165). Asimismo, se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo utilizando el punto de corte más óptimo detectado en el análisis de la curva Característica Operativa del Receptor (curva ROC, *Receiver operating characteristic* en inglés).

Finalmente, cabe destacar que en las publicaciones de esta tesis doctoral se ha trabajado con datos a nivel multicéntrico. Debido a este hecho, antes de realizar los modelos y/o correlaciones se exploró y cuantificó la heterogeneidad entre las diferentes cohortes. Para ello, todas las estimaciones fueron primero analizadas utilizando técnicas meta-analíticas. La heterogeneidad fue cuantificada utilizando el estadístico I^2 (162) con el paquete estadístico *meta* (166). Los I^2 obtenidos fueron $< 25\%$ (heterogeneidad baja) y los análisis se realizaron utilizando la variable cohorte como variable de ajuste.

RESULTADOS

Actividad física extracurricular y longitud del telómero

Resumen

Debido al posible efecto positivo de la AF sobre la salud a causa de sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, el objetivo de este trabajo fue explorar la asociación entre la AFE, utilizando el gasto energético en METs y la LT en niños/as a los 4 años y la LT a los 4 años y entre los 4 a los 8 años. Se utilizaron los datos de 639 niños/as del proyecto INMA. La media diaria de gasto energético en AFE (METs x hora/día) fue calculada en base a un cuestionario reportado por los padres, el cual recogía el tiempo en AFE y las actividades más frecuentes. Esta variable fue transformada y usada en terciles (bajo, medio y alto). La LT se determinó mediante qPCR a los 4 y los 8 años y se calculó la diferencia en el ranking de la LT entre los 4 y los 8 años. Se exploró la asociación entre ambas variables mediante modelos de regresión robusta múltiple. Se observó que aquellos niños/as situados en el tercil más alto de gasto energético en AFE (11,9-31,0 METs hora/día) mostraron un incremento en el ranking de la LT de 2,25% (IC95%: 0,01; 4,48; $p=0,04$) entre los 4 y 8 años, en comparación con aquellos localizados en el tercil más bajo (2,2-7,8 METs hora/día). No se observó ninguna otra asociación estadísticamente significativa más. En conclusión, un efecto beneficioso de la AFE se observó la diferencia de ranking de la LT entre los 4 y 8 años. En el caso de que otros resultados corroborasen estos hallazgos, la AFE debería recomendarse para reducir el daño celular durante las etapas tempranas de la vida.

Resultados

Características de la población de estudio

Las características de las parejas madre-hijo/a incluidas en este trabajo se muestran en la **Tabla 3**. Los niños/as presentaban una mediana (RI) de edad de 4,4 (4,3; 4,5) y 8,3 (7,9; 8,8) años en los seguimientos de los 4 y 8 años, respectivamente. A los 4 años, la mediana de consumo energético de los niños/as se situó en 1586 (1388; 1818) kcal/día y se observó una mediana de IMC de 16,0 (15,2; 16,9) kg/m². Además, estos niños/as consumían una mediana de 386 (278; 554) g/día de alimentos ultraprocesados y mostraban una mediana de TVP de 9,0 (5,8; 13,0) horas/semana. Respecto a las madres, se observó que su mediana de edad era de 31,0 (29,0; 34,0) años y su IMC periconcepcional, de 22,9 (20,8; 25,4) kg/m². En general, 484 (76,6%) de estas madres eran no fumadoras en la visita de los 4 años. Por último, un 40,7% de ellas tenían estudios universitarios, mientras que aquellas con primarios representaron el 18,3%.

Tabla 3. Características de las parejas madre-hijo/a los 4 años (n = 639).

Características de los niños/as	Mediana (IR)
Edad, años	4,4 (4,3; 4,5)
Edad al seguimiento, años	8,3 (7,9; 8,8)
Sexo, n (%)	
Masculino	328 (51,3)
Femenino	311 (48,7)
Parto pretérmino, n (%)	28 (4,4)
IMC, kg/m ²	16,0 (15,2; 16,9)
Consumo energético, kcal/día	1586 (1388; 1818)
Consumo de ultraprocesados, g/día	386 (278; 554)
Puntuación rMed	9,0 (7,0; 10,0)
TVP, horas/semana	9,0 (5,8; 13,0)
Duración del sueño, horas/semana	73,5 (70,0; 77,0)
AF extracurricular, METs hora/día	9,7 (7,0; 12,9)
Cohorte, n (%)	
Asturias	243 (38,0)
Guipúzcoa	130 (20,3)
Sabadell	266 (41,7)
Estación, n (%)	
Primavera	165 (25,9)
Verano	172 (26,9)
Otoño	151 (23,6)
Invierno	151 (23,6)
Características de las madres	
Edad, años	31,0 (29,0; 34,0)
IMC periconcepcional ^a , kg/m ²	22,9 (20,8; 25,4)
Fumadora ^b , si, n (%)	148 (23,4)
Nivel educativo, n (%)	
Universidad	260 (40,7)
Secundaria	262 (41,0)
Primaria	117 (18,3)

IR= rango intercuartílico; IMC= índice de masa corporal; rMed= *relative Mediterranean Diet*; AF= actividad física; MET= índice metabólico equivalente.

^aDatos disponibles para n= 636. ^bDatos disponibles para n= 632.

Asociación entre actividad física extracurricular y longitud del telómero.

En la **Tabla 4** se muestra la asociación entre AFE a los 4 años y la LT a los 4 años y el cambio en el ranking de la LT entre los 4 y 8 años. En el modelo 1 se puede observar que aquellos niños/as situados en el tercil más alto de AFE (11,9-31,0 METs hora/día) presentaban un incremento en el ranking de la LT del 2,37% (IC95%: 0,07; 4,67; $p = 0,04$) en comparación con aquellos niños/as del tercil más bajo (2,2-7,8 METs hora/día). Tras ajustar por covariables del niño/a y sus madres (modelo 2), esta asociación se mantuvo estable (% cambio= 2,40%; IC95%: 0,04; 4,75; $p = 0,04$). Además, esta asociación disminuyó ligeramente al ajustar por tiempo de seguimiento y la LT a los 4 años en el modelo 3 (% cambio = 2,25%; IC95%: 0,01; 4,48; $p = 0,04$). No se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa en el caso de los terciles de EFA bajo vs medio. Asimismo, no observamos ninguna asociación estadísticamente significativa respecto a la asociación transversal entre AFE y LT a los 4 años.

Análisis de sensibilidad

La asociación observada entre la media de gasto energético diario en AFE y el ranking de la LT (tercil bajo vs alto) se mantuvo robusta al ajustar por la adherencia a la dieta Mediterránea (% cambio = 2,21; IC95%: -0,01; 4,45; $p = 0,05$) o la duración del sueño (% cambio = 2,24; IC95%: -0,01; 4,47; $p = 0,04$). Respecto a las covariables de las madres, esta asociación experimentó una pequeña disminución tras ajustar por su IMC periconcepcional (2,10; IC95%: -0,15; 4,35; $p = 0,06$) y estatus de fumadora (% cambio = 2,12; IC95%: -0,12; 4,37; $p = 0,06$). Finalmente, se observó un modesto incremento tras excluir aquellos niños/as nacidos pretérmino (% cambio = 2,44; IC95%: -0,02; 4,92; $p = 0,05$).

Tabla 4. Asociación entre la media de gasto energético en actividad física extracurricular (METs hora/día) y longitud del telómero a los 4 años (n= 639) y el cambio en el ranking de la longitud del telómero entre los 4 y 8 años (n= 547).

Gasto energético ^d	n	Modelo 1 ^a		Modelo 2 ^b		Modelo 3 ^c	
		% cambio (IC95%)	P	% cambio (IC95%)	P	% cambio (IC95%)	P
Asociación 4 años							
Bajo (1,6-7,6)	202	Ref		Ref		-	-
Medio (7,7-11,6)	220	1,33 (-2,31; 2,02)	0,5	1,74 (-1,81; 5,41)	0,3	-	-
Alto (11,9-38,6)	217	-2,62 (-6,50; 1,43)	0,2	-1,95 (-5,93; 2,20)	0,4	-	-
Asociación 4-8 años							
Bajo (2,2-7,8)	186	Ref		Ref		Ref	
Medio (7,9-11,8)	180	-0,15 (-2,31; 2,02)	0,9	-0,04 (-2,16; 2,09)	0,9	0,25 (-1,76; 2,26)	0,8
Alto (11,9-31,0)	181	2,37 (0,07; 4,67)	0,04	2,40 (0,04; 4,75)	0,04	2,25 (0,01; 4,48)	0,04

IC = intervalo de confianza. ^aModelo 1: modelo ajustado por cohorte de origen y estación del seguimiento. ^bModelo 2: Modelo 1+ consumo energético del niño/a (kcal/día), consumo de alimentos ultraprocesados (g/día), sexo, IMC del niño/a (kg/m²), TVP (horas/semana), edad de la madre (años) y su nivel educativo (primaria, secundaria y universidad). ^cModelo 3: Modelo 2+ tiempo de seguimiento (años) y longitud del telómero a los 4 años. ^dLas asociaciones transversales fueron estimadas como % de cambio en la longitud del telómero leucocitario en comparación con el grupo de referencia de comportamientos sedentarios (tercil más bajo). Las asociaciones entre los 4 y los 8 años se estimaron como % de cambio en el ranking de la LT, un cambio negativo en el ranking evidencia una mayor aceleración en el acortamiento de la longitud del telómero en comparación con el grupo de referencia de comportamientos sedentarios (tercil más bajo).

Publicación I

Prieto-Botella D, Martens DS, Valera-Gran D, Subiza-Pérez M, Tardón A, Lozano M, Casas M, Bustamante M, Jimeno-Romero A, Fernández-Somoano A, Llop S, Vrijheid M, Nawrot TS, Navarrete-Muñoz EM. [Sedentary Behaviour and Telomere Length Shortening during Early Childhood: Evidence from the Multicentre Prospective INMA Cohort Study](#). *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2023; 20: 5134. doi:10.3390/ijerph20065134

Resumen

Los CS podrían estar relacionados con el acortamiento de la LT debido a su efecto proinflamatorio. Por ello, este estudio exploró la asociación entre los CS reportados por los progenitores de niños/as a los 4 años y su LT a los 4 años y entre los 4 y 8 años. Se analizaron niños/as pertenecientes al estudio INMA que participaron en la visita de seguimiento a los 4 años ($n = 669$) y 8 años ($n = 530$). Se utilizaron modelos de regresión lineal robusta múltiple para explorar la asociación entre la media de horas/día en CS (TVP, otros CS y CS total) categorizada en terciles (bajo, medio y alto) y la LT a los 4 años. Además, se evaluó la asociación entre CS a los 4 años y el ranking de la TL entre los 4 y 8 años. Los resultados mostraron que los niños/as que pasaban más tiempo en TVP a los 4 años (1,6-5,0 horas/día) presentaban una LT -3,9% (IC95%: -7,4; -0,4; $p = 0,03$) menor en comparación con el tercil más bajo (0,0-1,0 horas/día). Respecto al periodo entre los 4 y 8 años, un mayor TVP (tercil más alto vs tercil más bajo) se asoció con una disminución en el ranking de la LT del -1,9% (IC95%: -3,8; -0,1; $p = 0,03$). Los niños/as expuestos a mayor TVP a los 4 años mostraron una menor LT a los 4 años y entre los 4 y 8 años edad. Este estudio corrobora el potencial efecto negativo de los CS durante la infancia con respecto a la longevidad celular.

Resultados

Características de la población de estudio

Las características de la población de estudio en función de los terciles de CS totales (horas/día) se describen en la **Tabla 5**. Se observa que 350 fueron niños (52,3%) y la media (DE) de edad de los niños/as fue de 4,4 (0,2) y 8,5 (0,6) en las visitas de los 4 y 8 años, respectivamente. Respecto a los CS, los niños/as pasaban una mediana total de 2,6 (2,0; 3,6) horas/día en CS. Aquellos niños/as situados en el tercil más alto de CS mostraron una mayor ingesta energética y consumo de alimentos ultraprocesados. Asimismo, los niños/as agrupados en los terciles medio y alto de CS presentaron una menor AFE en comparación con aquellos situados en el tercil más bajo. Respecto a las madres, estas presentaron una edad media de 37,1 (4,2) años y una mediana de IMC periconcepcional de 22,9 (20,9; 25,5) kg/m^2 . Sin embargo, aquellas madres cuyos hijos/as se agrupaban en el tercil más alto de CS presentaban un mayor porcentaje de estudios primarios y secundarios, en comparación con el tercil más bajo.

Tabla 5. Características de las parejas madre-hijo/a del estudio INMA en función de los terciles de tiempo total en comportamientos sedentarios (horas/día) a los 4 años.

Características	Total	Terciles de tiempo total en comportamientos sedentarios			P ^a
		Bajo (0,0-2,2)	Medio (2,3-3,1)	Alto (3,2-7,9)	
Número de participantes, n (%)	669 (100)	223 (33,3)	226 (33,8)	220 (32,9)	
Características de los niños/as^b					
Edad, años, media (DE)	4,4 (0,2)	4,4 (0,2)	4,4 (0,2)	4,4 (0,2)	0,69
Edad al seguimiento, años, media (DE) ^c	8,5 (0,6)	8,3 (0,6)	8,5 (0,6)	8,6 (0,7)	0,001
Sexo, n (%)					
Niño	350 (52,3)	122 (54,7)	109 (48,2)	119 (54,1)	0,31
Niña	319 (47,7)	101 (45,3)	117 (51,8)	101 (45,9)	
Parto pretérmino, si, n (%) ^d	30 (4,5)	7 (3,2)	13 (5,8)	10 (4,6)	0,41
IMC, kg/m ²	16,0 (15,2; 17,0)	15,9 (15,1; 16,9)	16,0 (15,4; 17,1)	16,1 (15,2; 17,0)	0,61
Consumo energético, kcal/día	1583 (1390; 1820)	1542 (1345; 1751)	1593 (1394; 1846)	1616 (1453; 1862)	0,001
Consumo de ultraprocesados, g/día	381 (279; 554)	374 (269; 516)	379 (280; 563)	417 (291; 576)	0,05
Puntuación rMED	9,0 (7,0; 10,0)	9,0 (7,0; 11,0)	9,0 (7,0; 10,0)	8,0 (7,0; 10,0)	0,16
AF extracurricular, MET-horas/día	9,7 (6,8; 12,9)	10,0 (7,5; 13,5)	9,3 (6,6; 12,4)	9,5 (6,5; 12,5)	0,02
Estación de extracción sanguínea, n (%)					
Invierno	165 (24,7)	49 (22,0)	62 (27,4)	54 (24,5)	0,21
Primavera	177 (26,5)	56 (25,1)	64 (28,3)	57 (25,9)	
Verano	180 (26,9)	71 (31,8)	58 (25,7)	51 (23,2)	
Otoño	147 (21,9)	47 (21,1)	42 (18,6)	58 (26,4)	

Tabla 5. Continuación.

Características	Total	Terciles de tiempo total en comportamientos sedentarios			P ^a
		Bajo (0,0-2,2)	Medio (2,3-3,1)	Alto (3,2-7,9)	
Cohorte, n (%)					
Asturias	273 (40,8)	82 (36,8)	104 (46,0)	87 (39,5)	
Guipúzcoa	131 (19,6)	66 (29,6)	42 (18,6)	23 (10,5)	<0,001
Sabadell	265 (39,6)	75 (33,6)	80 (35,4)	110 (50,0)	
Características de las madres					
Edad, años, media (DE)	37,1 (4,2)	37,4 (4,0)	36,9 (4,0)	37,0 (4,4)	0,35
País de origen, España, n (%) ^e	626 (94,0)	212 (95,5)	209 (92,9)	205 (93,6)	0,48
IMC periconcepcional, kg/m ²	22,9 (20,9; 25,5)	22,3 (20,6; 25,1)	23,2 (21,2; 25,4)	22,9 (21,0; 26,2)	0,07
Fumadora, n (%) ^d					
Si	161 (24,1)	50 (22,7)	53 (23,7)	58 (26,7)	
No	500 (74,7)	170 (77,3)	171 (76,3)	159 (73,3)	0,59
Nivel educativo, n (%) ^e					
Universidad	265 (39,6)	104 (46,6)	95 (42,0)	66 (30,4)	
Secundaria	270 (40,4)	85 (38,1)	89 (39,4)	96 (44,2)	0,005
Primaria	131 (19,6)	34 (15,3)	42 (18,6)	55 (25,4)	

DE = desviación estándar; IMC = índice de masa corporal; rMED = *relative Mediterranean Diet*; AF = actividad física; MET = índice metabólico equivalente. ^aChi-cuadrado, Kruskal-Wallis y ANOVA test entre los terciles de tiempo total en comportamientos sedentarios. ^bLas características se describen como mediana (RI, rango intercuartílico) a no ser que se indique lo contrario. ^cDatos disponibles para n = 530. ^dDatos disponibles para n = 661. ^eDatos disponibles para n = 666.

Comportamientos sedentarios y longitud del telómero a los 4 años

En la **Tabla 6** se puede observar que el TVP se asoció negativamente con la LT en niños/as a los 4 años en todos los modelos analizados. En comparación con aquellos niños/as situados en el tercil más bajo de TVP, aquellos con una exposición de TVP media (1,1-1,5 horas/día) y alta (1,6-5,0 horas/día) mostraron una reducción en la LT de -3,3% (IC95%: -6,7;0,4; $p = 0,07$) y -3,9% (IC95%: -7,4; -0,4; $p = 0,03$), respectivamente. No se observaron estimaciones estadísticamente significativas en el caso de otros CS o el tiempo en CS total.

Asociación entre comportamientos sedentarios a los 4 años y el ranking de la longitud del telómero desde los 4 a los 8 años

Un mayor TVP se asoció con una reducción del ranking de la LT desde los 4 a los 8 años (**Tabla 6**). No obstante, estos resultados fueron observados en el modelo ajustado por el tiempo de seguimiento y la LT a los 4 años (modelo 4). En concreto, los niños/as situado/as en el tercil más alto de TVP presentaron un cambio negativo en el ranking de la LT (acortamiento acelerado de la LT) del -1,9% (IC95%: -3,8; -0,1; $p = 0,03$) en comparación con el tercil más bajo. No se observaron asociaciones estadísticamente significativas en el análisis de otros CS o tiempo total en CS.

Análisis de sensibilidad

La asociación entre un mayor TVP y la LT a los 4 años incrementó cuando se excluyeron los niños (-5,7%, IC95%: -10,6; -0,5) y experimentó una ligera bajada al excluir a las niñas (-3,4%, IC95%: -8,3; 1,7). Sin embargo, no se observó una interacción estadísticamente significativa entre TVP y el sexo de los niños/as ($p \geq 0,2$). El efecto observado en el caso de mayor TVP y el ranking de la LT de 4 a 8 años aumentó ligeramente al ajustar por las características de las madres (-2,3%, IC95%: -4,1; -0,4) y tras excluir a las niñas (-2,3%, IC95%: -4,6; 0,0). Además, esta estimación permaneció robusta tras ajustar por rMED, AFE, fecha de extracción sanguínea, IMC del niño/a y al excluir los partos pretérminos.

Tabla 6. Asociación entre comportamientos sedentarios en terciles (horas/día) y longitud del telómero a los 4 años y cambios en el ranking de la longitud del telómero desde los 4 a los 8 años.

	n	Modelo 1 ^a		Modelo 2 ^b		Modelo 3 ^c		Modelo 4 ^d		
		% cambio (IC 95%)	P	% cambio (IC 95%)	P	% cambio (IC 95%)	P	% cambio (IC 95%)	P	
Asociación 4 años (n= 669)^e										
TVP										
Bajo (0,0-1,0)	271	Ref		Ref		Ref				
Medio (1,1-1,5)	184	-3,4 (-6,9; 0,1)	0,05	-3,7 (-7,1; -0,1)	0,04	-3,3 (-6,7; 0,4)	0,07	-	-	-
Alto (1,6-5,0)	214	-4,3 (-7,6; -0,9)	0,01	-4,6 (-7,9; -1,1)	0,01	-3,9 (-7,4; -0,4)	0,03	-	-	-
Otros CS										
Bajo (0,0-1,0)	278	Ref		Ref		Ref				
Medio (1,1-1,5)	190	-2,1 (-5,5; 1,4)	0,22	-2,0 (-5,4; 1,5)	0,26	-2,4 (-5,8; 1,1)	0,17	-	-	-
Alto (1,6-4,4)	201	1,6 (-2,0; 5,3)	0,38	1,8 (-1,8; 5,5)	0,34	1,1 (-2,4; 4,8)	0,53	-	-	-
CS total										
Bajo (0,0-2,2)	223	Ref		Ref		Ref				
Medio (2,3-3,1)	226	-2,1 (-5,7; 1,7)	0,27	-2,1 (-5,7; 1,7)	0,28	-2,4 (-6,0; 1,4)	0,20	-	-	-
Alto (3,2-7,9)	220	-2,2 (-5,7; 1,4)	0,22	-2,1 (-5,6; 1,5)	0,24	-2,1 (-5,6; 1,5)	0,25	-	-	-
Asociación 4-8 años (n= 530)^f										
TVP										
Bajo (0,0-1,0)	219	Ref		Ref		Ref		Ref		
Medio (1,1-1,5)	143	-0,4 (-2,4; 1,5)	0,65	-0,3 (-2,2; 1,6)	0,76	-0,4 (-2,3; 1,6)	0,71	-1,0 (-2,8; 0,9)	0,30	0,30
Alto (1,6-5,0)	168	-1,6 (-3,5; 0,3)	0,10	-1,3 (-3,2; 0,6)	0,18	-1,3 (-3,3; 0,6)	0,16	-1,9 (-3,8; -0,1)	0,03	0,03
Otros CS										
Bajo (0,0-1,0)	227	Ref		Ref		Ref		Ref		
Medio (1,1-1,5)	152	0,7 (-1,1; 2,5)	0,43	0,7 (-1,0; 2,5)	0,41	0,8 (-1,0; 2,6)	0,37	0,7 (-1,1; 2,4)	0,45	0,45
Alto (1,6-4,4)	151	0,7 (-1,4; 2,8)	0,52	0,7 (-1,4; 2,8)	0,51	0,8 (-1,3; 2,9)	0,47	1,4 (-0,6; 3,3)	0,17	0,17
CS total										
Bajo (0,0-2,2)	177	Ref		Ref		Ref		Ref		
Medio (2,3-3,1)	177	0,1 (-1,7; 2,0)	0,88	0,2 (-1,7; 2,1)	0,81	0,2 (1,6; 2,1)	0,80	-0,2 (-2,0; 1,6)	0,82	0,82
Alto (3,2-7,9)	176	0,5 (-1,5; 2,4)	0,63	0,6 (-1,4; 2,5)	0,56	0,6 (-1,4; 2,5)	0,57	0,2 (-1,6; 2,1)	0,79	0,79

IC = intervalo de confianza; TVP = tiempo de visionado de pantallas; CS = comportamientos sedentarios. ^aModelo 1: modelo ajustado por fecha de recogida de muestra sanguínea y cohorte (Asturias, Guipúzcoa, Sabadell). ^bModelo 2: Modelo 1+ ajuste adicional por el consumo de energía total del niño/a (kcal/día), consumo de alimentos ultraprocesados (g/día) y edad (años). ^cModelo 3: Modelo 2+ ajuste adicional por sexo del niño/a ^dModelo 4: Modelo 3+ ajuste adicional por tiempo de seguimiento (años) y longitud del telómero leucocitario a los 4 años. ^eLas asociaciones transversales fueron estimadas como % de cambio en la longitud del telómero leucocitario en comparación con el grupo de referencia de comportamientos sedentarios (tercil más bajo). ^fLas asociaciones entre los 4 y los 8 años se estimaron como % de cambio en el ranking de la LT, un cambio negativo en el ranking evidencia una mayor aceleración en el acortamiento de la longitud del telómero en comparación con el grupo de referencia de comportamientos sedentarios (tercil más bajo).

Publicación II

Prieto-Botella D, Valera-Gran D, Santa-Marina L, Babarro I, Subiza-Pérez M, Casas M, Guxens M, Cárdenas-Fuentes G, Heude B, Bernard JY, Rosemary RCM, García-Aymerich J, Vrijheid M, Navarrete-Muñoz EM. [Validation of a Parent-Reported Physical Activity Questionnaire by Accelerometry in European Children Aged from 6 to 12 Years Old](#). *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2022; 19: 9178. doi:10.3390/ijerph19159178

Resumen

Disponer de cuestionarios validados de AF es crucial para recopilar esta información durante la infancia en estudios epidemiológicos de base poblacional. Por ello, en este trabajo se exploró la validez de un cuestionario de AF, reportado por los progenitores y basado en el CLASS, a través de acelerometría en niños/as europeos/as de 6 a 12 años. Se analizaron datos de 230 niños/as pertenecientes a los proyectos INMA y HELIX. Se calculó la diferencia entre la media de AFMV (minutos/día) medida por el cuestionario y el acelerómetro. Además, los factores asociados a esta diferencia se exploraron mediante regresión lineal robusta múltiple. El acuerdo entre ambos métodos de medición fue examinado mediante un gráfico de Bland-Altman. Respecto a la validez concurrente para medir AFMV, fue evaluada mediante correlaciones parciales de Spearman ajustadas por la cohorte de estudio de los participantes. Por último, se analizó la curva ROC para explorar la precisión del cuestionario para detectar niños/as físicamente activos según la OMS (≥ 60 minutos/día de AFMV). Se observó una correlación moderada entre ambos métodos ($\rho = 0,41$; $p < 0,001$). El sexo, específicamente las niñas, se asoció estadísticamente con la diferencia de AFMV entre los métodos utilizados. No obstante, este cuestionario identificó correctamente a los niños/as físicamente activos (área bajo la curva = 83,8% y 82,7% para niños y niñas, puntos de corte = 68,6 y 45,4 minutos/día de AFMV, respectivamente). En conclusión, este cuestionario puede clasificar a los niños/as físicamente activos, por lo que puede ser un instrumento útil para monitorizar la AF en intervenciones de salud dirigidas a esta población.

Resultados

Características de la población de estudio

En la **Tabla 7** se describen las características de las parejas madre-hijo/a por cohorte de estudio. En general, el 52,2% fueron niñas, variando entre el 37,8% y el 58,2% en función de la cohorte. Respecto a las categorías de IMC de los niños/as, se distribuyeron de forma similar entre las diferentes cohortes ($p = 0,17$). En general, el porcentaje de niños/as con sobrepeso/obesidad se situó en el 33,5%. Respecto a las madres, 128 (55,7%) tenía edad ≥ 31 años. Las madres más jóvenes se encontraban en las cohortes de BiB y EDEN. Se observó una sobrerrepresentación de familias con una situación socioeconómica alta en la cohorte de EDEN (80,0%).

Tabla 7. Características de las parejas madre-hijo/a en función de su cohorte de estudio y edad de los niños/as.

Características de los niños/as, n (%)	Total (n= 230)	Niños/as de 6-11 años			Niños/as de 10-12 años	P ^a
		BiB (n= 27)	INMA-Sabadell (n= 37)	EDEN (n= 30)	INMA-Guipúzcoa (n= 136)	
Sexo						0,064
Masculino	110 (47,8)	13 (48,1)	23 (62,2)	18 (60,0)	56 (41,2)	
Femenino	120 (52,2)	14 (51,9)	14 (37,8)	12 (40,0)	80 (58,2)	
IMC ^b						0,174
Sobrepeso/obesidad	77 (33,5)	8 (29,6)	14 (37,8)	5 (16,6)	50 (36,8)	
Normopeso	153 (66,5)	19 (70,4)	23 (62,2)	25 (83,4)	86 (63,2)	
Características de las madres, n (%)						
Grupos de edad ^c						<0,001
<31 años	102 (44,3)	18 (66,7)	12 (32,4)	20 (66,7)	52 (38,2)	
≥31 años	128 (55,7)	9 (33,3)	25 (67,6)	10 (33,3)	84 (61,8)	
Nivel socioeconómico						<0,001
Alto	92 (40,0)	9 (33,3)	14 (37,8)	24 (80,0)	45 (33,1)	
Bajo/Medio	138 (60,0)	18 (66,7)	23 (62,2)	6 (20,0)	91 (66,9)	

^aP-valor obtenido mediante Chi-cuadrado entre cohortes., ^bBasados en los puntos de corte de la Organización Mundial de la Salud, ^cPunto de corte basado en la media.

Niveles medios de actividad física moderada-vigorosa

Según los acelerómetros, los niños/as pasaban una media (DE) de 72,8 (43,2) minutos/día en AFMV (**Tabla 8**). En comparación, los minutos/día en AFMV medidos por el cuestionario fueron 79,2 (58,0). El sexo del niño/a se asoció estadísticamente con la diferencia entre ambos métodos (niñas vs niños = 15,2; IC95%: 2,3; 28,1; $p = 0,020$). De media, los progenitores de las niñas sobrestimaron la AFMV de 11,9 minutos/día. En el caso del resto de factores, no se observaron otras asociaciones (**Tabla 8**).

Validez concurrente

La correlación parcial de Spearman ajustada por cohorte entre la medición de AFMV del cuestionario y acelerómetro fue de 0,41 (IC95%: 0,30; 0,51; $p < 0,001$). Esta correlación se mantuvo robusta al ajustar por otras covariables como la edad del niño/a ($\rho = 0,41$, IC95%: 0,30; 0,51, $p < 0,001$) o su IMC ($\rho = 0,40$; IC95%: 0,29; 0,51; $p < 0,001$). Sin embargo, se observó un ligero descenso al ajustar por el sexo del niño/a ($\rho = 0,38$; IC95%: 0,26; 0,48; $p < 0,001$).

Acuerdo entre métodos

En el gráfico de Bland-Altman (**Figura 14**) se puede observar que la media del sesgo entre métodos (cuestionario vs acelerómetro) fue de 6,4 minutos/día de AFMV (límites de acuerdo al 95%: -91,9; 104,7). Un total de nueve participantes (3,9%) quedaron fuera de los límites de acuerdo. A su vez, los niños/as con una media de AFMV (cuestionario + acelerómetro) >100 minutos/día presentaron las mayores diferencias entre métodos.

Validez de grupos conocidos

Según los acelerómetros, el 51,7% de las niñas y el 60,0% de los niños fueron clasificados como físicamente activos/as según la OMS (≥ 60 minutos/día de AFMV). El análisis de la curva ROC mostró un área bajo la curva del 83,8% (IC95%: 76,6; 91,0%) y 82,7% (IC95%: 75,2; 90,3%) para niñas y niños, respectivamente (**Tabla 9**). Además, se estableció como punto de corte óptimo 68,6 minutos/día de AFMV en el cuestionario de AF para clasificar a los niños físicamente activos (sensibilidad = 72,7%; especificidad = 79,5%). Sin embargo, este punto de corte fue más bajo en el caso de las niñas (45,4 minutos/día de AFMV, sensibilidad = 96,8%, especificidad = 60,3%).

Tabla 8. Resultados de la regresión lineal de la diferencia entre el tiempo en actividad física moderada-vigorosa medida por el cuestionario y los acelerómetros ajustada por las características de las parejas madre-hijo/a.

	n	AFMV (minutos/día)				
		Cuestionario	Acelerómetro	Cuestionario – Acelerómetro		
		Media (DE)	Media (DE)	Diferencia	β^a (IC95%)	P
Total	230	79,2 (58,0)	72,8 (43,2)	6,4	-	-
Cohorte						0,781
BiB	27	52,3 (43,2)	42,1 (19,5)	10,2	Ref	
INMA-Sabadell	37	43,4 (27,0)	49,8 (24,3)	-6,4	-8,9 (-31,2; 13,5)	
EDEN	30	26,0 (22,9)	31,1 (21,8)	-5,1	-8,7 (-28,1; 10,8)	
INMA-Guipúzcoa	136	106,0 (56,4)	94,4 (40,5)	11,6	-4,0 (-25,4; 17,3)	
Características de los niños/as						
Sexo						0,020
Niño	110	84,8 (65,0)	84,5 (48,9)	0,3	Ref	
Niña	120	74,1 (50,4)	62,2 (34,1)	11,9	15,2 (2,3; 28,1)	
Grupos de edad^b						0,817
≤10.6 años	114	61,3 (46,2)	58,2 (33,2)	2,8	Ref	
>10.6 años	116	96,8 (63,0)	87,2 (47,0)	9,6	1,9 (-14,4; 18,2)	
IMC^c						0,299
Sobrepeso/obesidad	77	79,4 (58,8)	69,0 (43,7)	10,4	Ref	
Normopeso	153	79,1 (57,8)	74,7 (42,9)	4,4	-6,8 (-19,6; 6,1)	
Características de las madres						
Grupos de edad^b						0,451
<31 años	102	73,5 (55,5)	68,4 (44,6)	5,1	Ref	
≥31 años	128	83,8 (59,7)	76,4 (41,8)	7,4	-4,6 (-16,5; 7,4)	
Nivel socioeconómico						0,856
Alto	92	66,7 (51,4)	64,5 (44,4)	2,2	Ref	
Alto/Medio	138	87,6 (60,8)	78,4 (41,6)	9,2	1,1 (-11,1; 13,3)	

AFMV = actividad física moderada-vigorosa; DE = desviación estándar; IC = intervalo de confianza. ^aCoefficiente beta perteneciente a la regresión lineal robusta ajustada por cohorte y todas las características madre-hijo/a presentadas. ^bPunto de corte basado en la mediana. ^cBasado en los puntos de corte de la Organización Mundial de la Salud

Figura 14. Gráfico de Bland-Altman representando el sesgo medio (línea sólida) y los límites de acuerdo al 95% (líneas discontinuas) entre los minutos/día en actividad física moderada-vigorosa (AFMV) medidos por el cuestionario (reportado por los progenitores) y los acelerómetros.

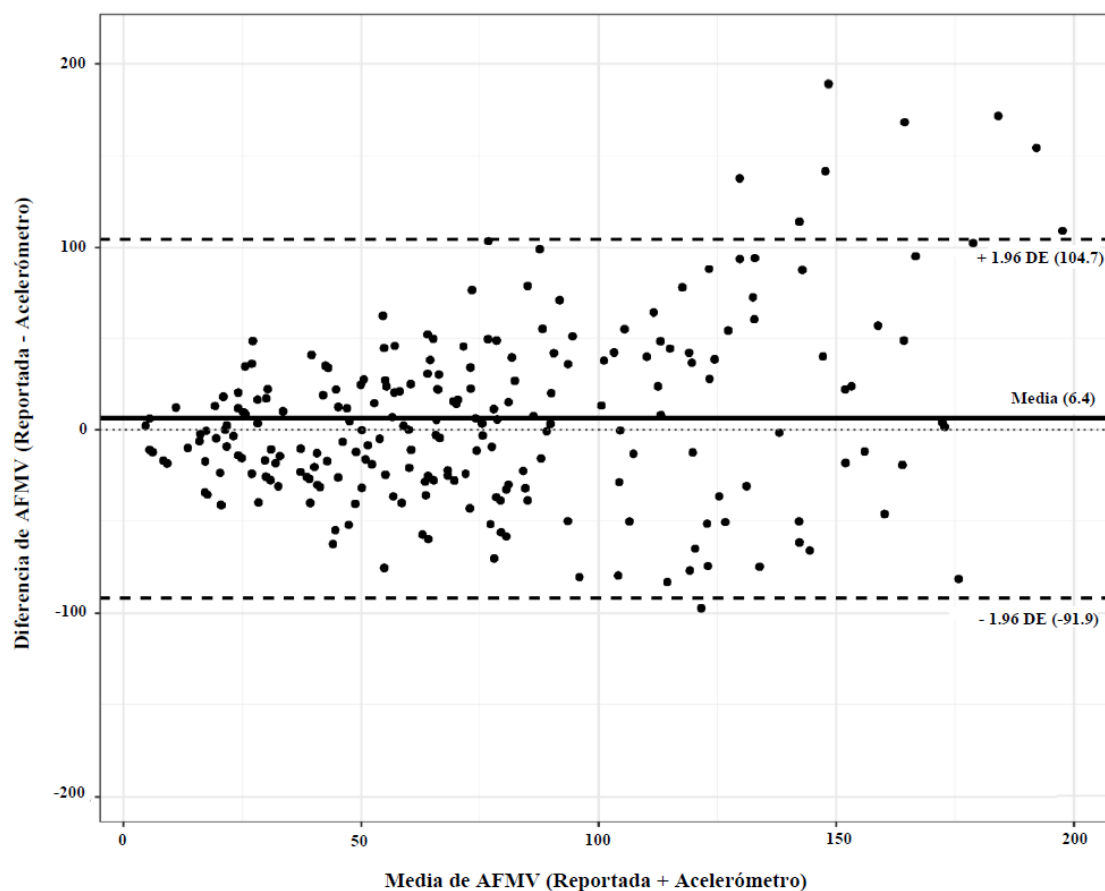


Tabla 9. Validez para identificar niños/as que acumularon ≥ 60 minutos/día de actividad física moderada-vigorosa según la acelerometría en el cuestionario.

	Niñas (n = 120)	Niños (n= 110)
Punto de corte AFMV del cuestionario ^a	45,4 (minutos/día)	68,6 (minutos/día)
Sensibilidad (IC95%)	96,8% (88,8; 99,6)	72,7% (60,4; 83,0)
Especificidad (IC95%)	60,3% (46,6; 73,0)	79,5% (64,7; 90,2)
Valor predictivo positivo (IC95%)	72,3% (61,4; 81,6)	84,2% (72,1; 92,5)
Valor predictivo negativo (IC95%)	94,6% (81,8; 99,3)	66,0% (51,7; 78,5)
Área bajo la curva (IC95%) ^a	83,8% (76,6; 91,0)	82,7% (75,2; 90,3)
Niños/as físicamente activos/as ^b	51,7% (42,4; 60,9)	60,0% (50,2; 69,2)

AFMV = actividad física moderada-vigorosa; IC = intervalo de confianza. ^aBasado en el análisis de la curva ROC.

^b ≥ 60 minutos/día vs < 60 minutos/día de AFMV según los acelerómetros.

DISCUSIÓN

La síntesis de los principales resultados obtenidos en esta tesis doctoral nos muestra que un mayor gasto energético proveniente de la AFE a los 4 años se asociaba positivamente con un aumento en la diferencia del ranking en la LT entre los 4-8 años. En contraposición, se observó que una mayor exposición al tiempo total en CS, especialmente al TVP, se asoció de forma negativa a la LT a los 4 años y entre los 4-8 años. Por último, observamos una validez moderada del cuestionario para medir AFMV del cuestionario comparándolo los resultados con la información obtenida por acelerometría. Además, se observaron mayores diferencias entre la información del cuestionario y la acelerometría en el caso de las niñas. Asimismo, este cuestionario mostró unos buenos índices de rendimiento para clasificar aquellos/as niños/as físicamente activos/as según la recomendación de la OMS. Por ello, este cuestionario resultará útil para evaluar la AF en la infancia y preadolescencia.

Actividad física extracurricular y longitud del telómero

Los hallazgos de este trabajo mostraron que aquellos/as niños/as situado/as en el tercil más alto de gasto energético diario en AFE a los 4 años mostraron un incremento de la LT del 2,25% entre los 4 y 8 años. A pesar de que no existen estudios previos sobre la asociación entre AFE y LT en la infancia, actualmente contamos con algunos estudios sobre el efecto general de la AF en la LT.

Los resultados observados en este trabajo coinciden con los resultados obtenidos en el ensayo clínico aleatorizado de Ojeda-Rodríguez y colegas realizado en niños/as entre 7 y 16 años con obesidad abdominal (108). Estos autores observaron que, tras una intervención de estilos de vida en la cual se animó a los niño/as a practicar 200 minutos/día de AF, el incremento de 1 MET de AF se asoció con un aumento de 26 unidades en ratio de la LT (108). Estos resultados obtenidos a nivel experimental, unido al hecho de que Ojeda-Rodríguez utilizó medidas directas de AF, podrían reforzar los resultados obtenidos a nivel observacional en esta tesis doctoral. Asimismo, ajustamos los modelos estadísticos con el IMC de los niños/as para controlar su posible confusión. Sin embargo, los resultados mostraron que el efecto positivo de la AFE sobre la LT fue independiente del IMC.

El efecto potencialmente beneficioso de la AFE que observamos en nuestro estudio podría ser consistente con lo mostrado por el estudio de Zhu y colegas (2011) en el que la AF vigorosa se asociaba positivamente con la LT de mujeres adolescentes (107). No obstante, un estudio longitudinal más reciente con 150 niño/as (3-10 años) con un seguimiento entre 5 y 7 años no encontró asociación entre la AF reportada por los progenitores y la LT (109). Esta inconsistencia entre los resultados podría deberse a la variable de AF utilizada en los estudios. En el estudio de

De Ruyter y colegas se utilizó un cuestionario de AF reportado por los progenitores para medir el tiempo total en AF (109). Aunque en nuestro estudio también se utilizó un cuestionario reportado por los progenitores, se midió AFE y no AF total. Además, tuvimos en cuenta la intensidad de la AFE para calcular el gasto energético diario. Esta diferencia en las mediciones podría explicar la incongruencia entre ambos estudios. No obstante, podrían existir otras causas como la diferencia muestral o la mayor heterogeneidad de edades en el caso del estudio de De Ruyter y colegas (109).

Existe evidencia sobre los mecanismos biológicos por los cuales la AF tiene un efecto beneficioso sobre la LT, por lo que podrían ser extensibles con respecto a la AFE. Diversos estudios han señalado que el efecto producto de la AF sobre la LT deriva de su impacto sobre el estrés oxidativo y la inflamación crónica (98,106). De hecho, diversas revisiones sistemáticas realizadas en población adulta han señalado que la AF puede disminuir la concentración de biomarcadores de daño del ADN, de proteínas ligadas a la apoptosis celular como *p16* y *p53* e incrementar la actividad de la telomerasa (98,106,167). Asimismo, se ha sugerido que la AF podría actuar movilizandando productos metabólicos de desecho, reduciendo el estrés oxidativo e incrementando la preservación de los tejidos (167). Respecto a los efectos en población infantil, se ha observado que la AF está inversamente asociada con niveles en sangre de biomarcadores proinflamatorios como IL-6 o leptina en niños/as de 6 a 8 años (110).

Por otra parte, y aunque la evidencia se centra en población adulta, la AF también ha sido vinculada con una mejor función mitocondrial, lo que puede mejorar la producción de energía y reducir la acumulación de radicales libres oxidantes (168). En este sentido, el aumento del flujo sanguíneo y oxigenación durante la AF mejoran la entrega de nutrientes y oxígeno a las células, promoviendo así su óptimo funcionamiento (169). Asimismo, la AF incrementa la demanda energética del organismo, lo que puede estimular la biogénesis mitocondrial, desencadenando así un aumento en su densidad y función, lo cual mejora la capacidad de producción de energía de las células (169). Debido a ello, se ha sugerido que la AF puede aumentar la capacidad antioxidante de las mitocondrias manteniendo un nivel fisiológicamente adecuado de ROS (170).

Por último, se ha de destacar que la AF no siempre se asocia a un efecto antioxidante a nivel celular. De hecho, durante el ejercicio se produce un aumento en la producción de ROS, lo que desencadenaría el estrés oxidativo en las células (169). Sin embargo, el cuerpo también produce una respuesta antioxidante para contrarrestar el daño oxidativo. La AF puede aumentar la producción de enzimas antioxidantes, como las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, que ayudan a neutralizar los radicales libres y reducir el estrés oxidativo (171). No obstante, un exceso de AF o un entrenamiento intenso y prolongado podrían tener efectos opuestos, perjudicando así la salud celular (98).

En resumen, los efectos de la AF sobre la salud y rendimiento metabólico celular podrían reducir el estrés oxidativo, la inflamación crónica y mantendrían la estabilidad genómica en las etapas tempranas de la vida. Este efecto se debería al equilibrio entre los procesos estresores y antioxidantes a nivel celular, por lo que una práctica adecuada y equilibrada podría contribuir al mantenimiento de la LT.

Comportamientos sedentarios y longitud del telómero

Inversamente a lo observado en el caso de la AF, nuestros resultados también mostraron que los niño/as con mayor TVP presentaron una reducción del 3,9% en la LT a los 4 años y del 1,9% en el ranking de la LT entre los 4-8 años. Hasta la fecha, son muy pocos los estudios que han explorado el efecto de los CS sobre la LT en la infancia. En particular, un ensayo clínico aleatorizado publicado por Ojeda-Rodríguez y colegas en 2021 con 121 niños/as españoles (7-16 años) con obesidad abdominal, mostró que un aumento del tiempo en CS provocaba una reducción en la LT (108). Basándonos en este estudio, dado que el IMC de los niños/as podría actuar como una importante variable de confusión, incluimos el IMC como variable de ajuste en el análisis de sensibilidad de nuestros resultados. No obstante, no se observaron cambios sustanciales, por lo que los resultados sugieren que el efecto negativo del TVP sobre la LT fuera probablemente independiente del IMC. En población adulta, el estudio de Xue y colegas (2017) mostró que el incremento en una hora/día viendo la televisión se asociaba con una reducción en la LT de 72 bp en 518 participantes con edades entre 20 y 70 años (135). Además, también mostraron que aquellos participantes de 20-40 años situados en el tercil más alto de horas/día viendo la televisión presentaron una LT 4,0% menor, en comparación con aquellos en el tercil más bajo (135), un resultado que se asemeja a lo observado en este trabajo (3,9%).

A pesar de que actualmente no existe una evidencia clara acerca de los mecanismos biológicos por los cuales los CS afectarían a la LT, se ha sugerido que el aumento de la inflamación crónica sistémica y el estrés oxidativo podrían ser factores importantes en este proceso. La inflamación crónica sistémica producida por una activación continua del sistema inmunológico provoca un incremento de citoquinas y adipocinas de carácter proinflamatorio (172). Estas moléculas podrían actuar afectando la homeostasis telomérica, promoviendo la apoptosis y senescencia celular y con ello, un mayor acortamiento de la LT (172). Asimismo, el estrés oxidativo producido por el desequilibrio entre la producción de ROS derivado de una menor AF (169) puede dañar directamente a la LT. En este sentido, estudios de experimentación animal han mostrado que la inactividad física podría desencadenar un aumento de citoquinas y adipocinas proinflamatorias (110,173). De manera similar, estudios realizados en población infantil han mostrado que los CS se asociaron con un aumento de la concentración de biomarcadores inflamatorios en niño/as de 6-8 años como CRP, leptina o IL-6 (110). Asimismo, un mayor tiempo de visualizado de televisión se ha asociado con mayores niveles de CRP y sVCAM-1, un

biomarcador de disfunción endotelial, en niño/as con edades entre 7 y 10 años (137). En resumen, aunque aún no se conocen de forma precisa los mecanismos biológicos, se sugiere que los CS podrían aumentar la inflamación crónica sistémica y el estrés oxidativo, contribuyendo así al acortamiento de la LT.

Validez del cuestionario de actividad física

En lo referente a la segunda publicación, nuestros resultados sobre la validación del cuestionario para medir AF en niño/as en edad escolar de entre 6 a 12 años mostraron una correlación moderada ($\rho = 0,41$) entre la medida de AFVM del cuestionario y los acelerómetros, aunque este valor se encontraba en línea con la literatura actual (127). De hecho, una revisión sistemática publicada por Hidding y colegas en 2015 identificó que solo 7 de los 29 cuestionarios de AF orientados a la infancia (≥ 6 a < 12 años) mostraron correlaciones mayores a 0,50 (85). Esta moderada correlación podría ser debida a que los progenitores podrían tener problemas para identificar correctamente los hábitos referentes a la AF de sus hijos/as (87). Asimismo, es importante recalcar que el cuestionario pregunta sobre la AF realizada en una semana típica, cuando el acelerómetro recoge la AF realizada en una semana específica, lo que puede dar lugar a inconsistencias entre ambos métodos.

Por otro lado, se evidenció que los progenitores sobreestimaban una media de 6,4 minutos/día de AFVM. Este resultado concuerda con estudios previos como la revisión sistemática llevada cabo por Adamo y colegas (174). En esta revisión se mostró que el 72% de los instrumentos de evaluación indirectos de AF orientados a la infancia sobreestimaban los resultados obtenidos por su contraparte de medidas directas (174). Unos resultados similares pueden observarse en la revisión sistemática llevada a cabo por Hidding, donde se identificó que el rango de la diferencia media entre los valores de los cuestionarios vs acelerómetros se encontraba entre -15,6 y 117,6 minutos/día de AFMV (85). No obstante, la sobreestimación obtenida en este caso se encontró entre las más bajas reportadas en las mencionadas revisiones (85,174). Los potenciales sesgos de recuerdo e información descritos previamente podrían estar detrás de la diferencia observada en este estudio (87,175). Asimismo, esta diferencia se asoció con el sexo del niño/a. Específicamente, los progenitores de niñas tendían a sobreestimar la actividad de sus hijas. Una posible explicación de este hecho consiste en el nivel basal de AF que presentan las niñas, el cual es más bajo en comparación con los niños (79,176). Se sugiere que los progenitores podrían comparar la AF de sus hijos/as con otros niños/as de su misma edad a la hora de cumplimentar los cuestionarios. Por ello, los progenitores de niñas podrían ser más propensos a sobreestimar la actividad física de su hija debido a su marco de referencia (177). Este hallazgo ha sido compartido con otros estudios y muestra la importancia de tener en cuenta el sexo a la hora de investigar temas relacionados con la AF (177–179).

Con respecto a la concordancia entre métodos, el análisis del gráfico de Bland-Altman sugiere que el cuestionario analizado proporciona estimaciones razonables de AFMV. Sin embargo, se identificó un ligero sesgo positivo en línea con otros estudios publicados. Además, aquellos niños/as con una media de AFMV superior a 100 minutos/día (reportada por los progenitores + acelerómetro) fueron los que presentaron mayores diferencias entre métodos. Este hallazgo fue observado a su vez en la versión china del CLASS (180). Los autores establecieron que este sesgo podría atribuirse a la naturaleza intermitente de la AF, ya que los niños/as suelen realizarla en varios episodios. Debido a ello, los progenitores podrían indicar que sus hijos/as juegan una hora al baloncesto como AFMV, pero la intensidad de la AF durante esa hora pudo haber sido menor en varios episodios (180).

Finalmente, el cuestionario validado mostró un adecuado poder discriminante para clasificar niños/as físicamente activos según la OMS (≥ 60 minutos/día AFMV). El punto de corte establecido para las niñas (45,4 minutos/día) fue inferior en el caso de los niños (68,6 minutos/día) posiblemente debido al menor nivel basal de AF de las niñas observado en estudios previos (79,176). Se ha sugerido que los progenitores de las niñas podrían esperar un estilo de juego más pasivo e inactivo (181), pero las causas deben ser todavía esclarecidas.

1. Limitaciones y fortalezas generales del estudio

Los resultados presentados en esta tesis doctoral no pueden ser interpretados sin tener en cuenta sus limitaciones.

En relación con los análisis de AFE y CS, se debe considerar, en primer lugar, que el cuestionario utilizado para realizar las estimaciones de CS no ha sido validado en población española. Sin embargo, a pesar de que pueda existir un potencial riesgo de clasificación, este debería ser no diferencial. Respecto a la medición de la LT, se ha comentado que se utilizaron diferentes kits de extracción de ADN entre cohortes y que la LT a los 8 años de los niños/as de Sabadell fue media con un protocolo diferente de qPCR. El potencial impacto de esta limitación fue abordado normalizando la LT de forma separada por cohorte, y utilizando el ranking de la LT en el análisis estadístico. En tercer lugar, se ha utilizado el gasto energético total en AFE, pero no en actividades específicas, como aquellas moderadas o vigorosas. A su vez, no se puede descartar la presencia de confusión residual o del efecto de variables de exposición desconocidas. Sin embargo, en ambos trabajos se ha realizado un ajuste de los modelos principales considerando aquellas características de la madre y su hijo/a que podrían estar especialmente vinculadas con la AF y los CS de los niños/as.

Aunque este trabajo presente limitaciones, los resultados son de gran importancia para el desarrollo de políticas y estrategias en salud pública en el futuro ya que trata de temas considerados como prioritarios durante las primeras etapas de vida. En especial, para la

promoción de la AF durante la infancia y la prevención de un excesivo tiempo en CS, como pasar largas horas frente a la televisión.

A pesar de estas limitaciones, estos trabajos presentan diversas fortalezas que deben ser mencionadas. La principal de ellas radica en el carácter prospectivo del estudio INMA, el cual nos ha permitido evaluar el efecto de los CS y la AFE sobre la LT entre los 4 y 8 años. Además, se han realizado diversos análisis de sensibilidad que refuerzan los resultados observados.

Respecto a la *publicación II*, esta no se encuentra exenta de limitaciones y fortalezas. En primer lugar, se debe considerar que la muestra empleada podría no ser representativa debido a que forma parte de una submuestra de los proyectos INMA y HELIX. No obstante, este trabajo contó con un diseño multicéntrico europeo que podría proporcionar información de interés para las cohortes participantes en estos proyectos. Por otra parte, se puede apreciar una sobrerrepresentación de participantes provenientes de Guipúzcoa, los cuales, respecto a las otras cohortes, fueron evaluados mediante un acelerómetro diferente. Sin embargo, se realizó el tratamiento de los datos provenientes de los acelerómetros siguiendo criterios compartidos. Además, observamos una correlación similar entre las medidas de AFMV tras excluir la cohorte de Guipúzcoa. Finalmente, en este trabajo se tuvo en cuenta el sexo de los niños/as para explorar posibles diferencias que pudiesen afectar a la validez del cuestionario.

CONCLUSIONES

En función de los objetivos propuestos en la presente tesis doctoral, los resultados obtenidos permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. Respecto a la asociación entre AFE y LT, aquellos niños/as que presentaron un mayor gasto energético en AFE a los 4 años (11,9-31,0 METs hora/día) mostraron un aumento del 2,25% en el ranking de la LT entre los 4 y 8 años. Un incremento en el ranking de la LT evidencia un posible efecto positivo de la AFE para desacelerar el acortamiento de la LT. Por ello, este hallazgo corrobora el posible efecto positivo de la AF incluso a nivel del envejecimiento celular.

2. Con relación a los CS, los niños/as que mostraban un mayor TVP a los 4 años (1,6-5,0 horas/día) presentaron una LT un 3,9% menor en comparación con aquellos/as con un TVP reducido (0,0-1,0 horas/día). Este efecto negativo de un mayor TVP a los 4 años sobre la LT se confirmó de forma prospectiva al asociarse con una disminución del ranking de la LT entre los 4 y 8 años del 1,9%. Este hallazgo muestra el potencial efecto adverso de los CS sobre la salud humana.

3. En referencia a la validación del cuestionario de AF en niño/as de 6-12 años, la validez de las medidas de AFMV entre el cuestionario y el acelerómetro fue moderada ($\rho = 0,41$), por lo que las estimaciones individuales deben ser consideradas con cautela. Sin embargo, este cuestionario mostró una aceptable precisión a la hora de detectar niños/as físicamente activos según la OMS (área bajo la curva $> 80\%$) y podría ser adecuado para monitorizar intervenciones de salud pública o para recoger datos de AF en grandes estudios epidemiológicos.

CONCLUSIONS

The following conclusions can be drawn from the obtained results in this doctoral thesis:

1. A higher energy expenditure in extracurricular physical activity at 4 years (11,9-31,0 METs hours/day) was associated with an increment in the telomere length (TL) rank between 4 and 8 years. An increment in the TL rank evidenced a possible TL shortening deceleration. Thus, these results corroborate the positive effect of physical activity (PA), even on cellular ageing.

2. Children that showed higher sedentary behavior (SB) at 4 years (1,6-5,0 hours/day) showed a decrement in the LT compared to those with lower SB. Furthermore, this higher SB negative effect on TL was prospectively confirmed. Specifically, higher SB at 4 years was associated with a -1,9% decrement in the LT rank between 4 and 8 years. These findings show the potential adverse effect of SB on human health.

3. Regarding the PA questionnaire validation in children from 6-12 years, the validity of assessing moderate-to-vigorous PA time between the questionnaire and the accelerometer was moderate ($\rho = 0,41$). However, based on the World Health Organization guidelines, this questionnaire showed an acceptable accuracy in detecting physically active children. For this reason, this questionnaire could be suitable for PA data gathering in epidemiological studies or monitoring public health interventions.

IMPLICACIONES PARA LA SALUD PÚBLICA

Las conclusiones extraídas de esta tesis doctoral en función de los resultados obtenidos resultan de gran interés para la salud pública.

Realizar AF y limitar los CS son dos estilos de vida potencialmente modificables que han sido objeto de atención en las últimas décadas debido a su posible relación con enfermedades no transmisibles y el envejecimiento. El envejecimiento es un reto para la salud pública y un tema prioritario en la investigación biomédica y sociosanitaria actual. Si bien el envejecimiento representa un logro de la sociedad moderna, es esencial garantizar un envejecimiento saludable. Por ello, los resultados de esta tesis doctoral muestran que la preocupación por envejecer saludablemente debe comenzar en las primeras etapas de vida.

En este sentido, se debe remarcar que la realización de AF y la limitación de los CS resulta crucial durante la infancia. Este hecho se refuerza si consideramos que, según la evidencia científica, aquellos niño/as más activo/as o sedentario/as presentan más riesgo de seguir siéndolo durante la adolescencia e, incluso, la adultez. Por lo tanto, fomentar la AF en la infancia puede tener efectos beneficiosos a largo plazo para la salud. Por ello, los resultados de esta tesis doctoral podrían servir a organismos públicos nacionales e internacionales para justificar el refuerzo de programas dirigidos al fomento y práctica de la AF durante las primeras etapas de la vida. A su vez, los hallazgos obtenidos podrían ser utilizados por los facultativos de atención primaria, pediatras y maestros/as de centros educativos para fomentar la AF y limitar los CS entre las familias y los propios niños/as. Estas medidas son a su vez justificadas y necesarias si tenemos en cuenta la escasa proporción de niños/as y adolescentes que cumplen con las recomendaciones actuales de AF.

Debido a esta importancia, los resultados de esta tesis doctoral han sido difundidos en numerosos congresos internacionales. Además, y con referencia a la población general, se han hecho llegar estos resultados a las familias pertenecientes al estudio INMA a través de una infografía, una noticia y se dispuso un video en *YouTube* (<https://www.youtube.com/@UmhEs>) para todas las personas interesadas.

Por último, cabe destacar que esta tesis doctoral corrobora el potencial efecto positivo de la AF y negativo de los CS en población infantil observado en estudios previos. Sin embargo, lo hace utilizando marcadores de edad biológica y podría servir de base para futuros estudios longitudinales de mayor tamaño que posibiliten desarrollar un conocimiento extenso sobre esta temática.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *Journal of Molecular Biology*. 1978;120(1):33–53.
2. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991;350(6319):569–73.
3. O’Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(3):171–81.
4. Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell*. 2001;106(6):661–73.
5. von Zglinicki T, Martin-Ruiz CM. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr Mol Med*. 2005;5(2):197–203.
6. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci*. 2002;27(7):339–44.
7. Kawanishi S, Oikawa S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1019:278–84.
8. Petersen S, Saretzki G, von Zglinicki T. Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. *Exp Cell Res*. 1998;239(1):152–60.
9. Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet*. 2008;42:301–34.
10. Chan SWL, Blackburn EH. New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene*. 2002;21(4):553–63.
11. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*. 2007;130(2):223–33.
12. Chen JH, Hales CN, Ozanne SE. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res*. 2007;35(22):7417–28.
13. Montpetit AJ, Alhareeri AA, Montpetit M, Starkweather AR, Elmore LW, Filler K, et al. Telomere length: a review of methods for measurement. *Nurs Res*. 2014;63(4):289–99.
14. Lai TP, Wright WE, Shay JW. Comparison of telomere length measurement methods. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018;373(1741):20160451.
15. Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(3):e21.
16. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(10):e47.
17. Aubert G, Hills M, Lansdorp PM. Telomere length measurement—caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat Res*. 2012;730(1–2):59–67.

18. Kimura M, Stone RC, Hunt SC, Skurnick J, Lu X, Cao X, et al. Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. *Nat Protoc.* 2010;5(9):1596–607.
19. Mender I, Shay JW. Telomere Restriction Fragment (TRF) Analysis. *Bio Protoc.* 2015;5(22):e1658.
20. Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, et al. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet.* 1996;5(5):685–91.
21. Canela A, Vera E, Klatt P, Blasco MA. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(13):5300–5.
22. Baerlocher GM, Vulto I, de Jong G, Lansdorp PM. Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). *Nat Protoc.* 2006;1(5):2365–76.
23. Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol.* 1998;16(8):743–7.
24. Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D. Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat Genet.* 2003;33(2):203–7.
25. Bendix L, Horn PB, Jensen UB, Rubelj I, Kolvraa S. The load of short telomeres, estimated by a new method, Universal STELA, correlates with number of senescent cells. *Aging Cell.* 2010;9(3):383–97.
26. Lai TP, Wright WE, Shay JW. Generation of digoxigenin-incorporated probes to enhance DNA detection sensitivity. *Biotechniques.* 2016;60(6):306–9.
27. Lai TP, Zhang N, Noh J, Mender I, Tedone E, Huang E, et al. A method for measuring the distribution of the shortest telomeres in cells and tissues. *Nat Commun.* 2017;8(1):1356.
28. Daniali L, Benetos A, Susser E, Kark JD, Labat C, Kimura M, et al. Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat Commun.* 2013;4(1):1597.
29. Sabharwal S, Verhulst S, Guirguis G, Kark JD, Labat C, Roche NE, et al. Telomere length dynamics in early life: the blood-and-muscle model. *The FASEB Journal.* 2018;32(1):529–34.
30. Demanelis K, Jasmine F, Chen LS, Chernoff M, Tong L, Delgado D, et al. Determinants of telomere length across human tissues. *Science.* 2020;369(6509):eaaz6876.
31. Fyhrquist F, Saijonmaa O, Strandberg T. The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2013;10(5):274–83.
32. Wang Q, Zhan Y, Pedersen NL, Fang F, Hägg S. Telomere Length and All-Cause Mortality: A Meta-analysis. *Ageing Research Reviews.* 2018;48:11–20.
33. Wang J, Dong X, Cao L, Sun Y, Qiu Y, Zhang Y, et al. Association between telomere length and diabetes mellitus: A meta-analysis. *J Int Med Res.* 2016;44(6):1156–73.

34. Smith L, Luchini C, Demurtas J, Soysal P, Stubbs B, Hamer M, et al. Telomere length and health outcomes: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies. *Ageing Res Rev.* 2019;51:1–10.
35. The top 10 causes of death [Internet]. [cited 2023 Feb 21]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
36. Huzen J, Peeters W, de Boer RA, Moll FL, Wong LSM, Codd V, et al. Circulating leukocyte and carotid atherosclerotic plaque telomere length: interrelation, association with plaque characteristics, and restenosis after endarterectomy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(5):1219–25.
37. Nzietchueng R, Elfarra M, Nloga J, Labat C, Carteaux JP, Maureira P, et al. Telomere length in vascular tissues from patients with atherosclerotic disease. *J Nutr Health Aging.* 2011;15(2):153–6.
38. Martens DS, Sleurs H, Dockx Y, Rasking L, Plusquin M, Nawrot TS. Association of Newborn Telomere Length With Blood Pressure in Childhood. *JAMA Netw Open.* 2022;5(8):e2225521.
39. De Vitis M, Berardinelli F, Sgura A. Telomere Length Maintenance in Cancer: At the Crossroad between Telomerase and Alternative Lengthening of Telomeres (ALT). *International Journal of Molecular Sciences.* 2018;19(2):606.
40. Panossian LA, Porter VR, Valenzuela HF, Zhu X, Reback E, Masterman D, et al. Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer’s disease status. *Neurobiology of Aging.* 2003;24(1):77–84.
41. Fani L, Hilal S, Sedaghat S, Broer L, Licher S, Arp PP, et al. Telomere Length and the Risk of Alzheimer’s Disease: The Rotterdam Study. *J Alzheimers Dis.* 73(2):707–14.
42. Dugdale HL, Richardson DS. Heritability of telomere variation: it is all about the environment! *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2018;373(1741):20160450.
43. Bountziouka V, Musicha C, Allara E, Kaptoge S, Wang Q, Angelantonio ED, et al. Modifiable traits, healthy behaviours, and leukocyte telomere length: a population-based study in UK Biobank. *The Lancet Healthy Longevity.* 2022;3(5):e321–31.
44. Miri M, Nazarzadeh M, Alahabadi A, Ehrampoush MH, Rad A, Lotfi MH, et al. Air pollution and telomere length in adults: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Environ Pollut.* 2019;244:636–47.
45. Astuti Y, Wardhana A, Watkins J, Wulaningsih W, PILAR Research Network. Cigarette smoking and telomere length: A systematic review of 84 studies and meta-analysis. *Environ Res.* 2017;158:480–9.
46. Topiwala A, Taschler B, Ebmeier KP, Smith S, Zhou H, Levey DF, et al. Alcohol consumption and telomere length: Mendelian randomization clarifies alcohol’s effects. *Mol Psychiatry.* 2022;27(10):4001–8.
47. Mundstock E, Sarria EE, Zatti H, Mattos Louzada F, Kich Grun L, Herbert Jones M, et al. Effect of obesity on telomere length: Systematic review and meta-analysis. *Obesity.* 2015;23(11):2165–74.
48. Alonso-Pedrero L, Ojeda-Rodríguez A, Martínez-González MA, Zalba G, Bes-Rastrollo M, Marti A. Ultra-processed food consumption and the risk of short telomeres in an elderly

- population of the Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) Project. *Am J Clin Nutr.* 2020;111(6):1259–66.
49. Lin J, Epel E. Stress and telomere shortening: Insights from cellular mechanisms. *Ageing Res Rev.* 2022;73:101507.
 50. Barragán R, Ortega-Azorín C, Sorlí JV, Asensio EM, Coltell O, St-Onge MP, et al. Effect of Physical Activity, Smoking, and Sleep on Telomere Length: A Systematic Review of Observational and Intervention Studies. *J Clin Med.* 2021;11(1):76.
 51. Canudas S, Becerra-Tomás N, Hernández-Alonso P, Galié S, Leung C, Crous-Bou M, et al. Mediterranean Diet and Telomere Length: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Advances in Nutrition.* 2020;11(6):1544–54.
 52. Song S, Lee E, Kim H. Does Exercise Affect Telomere Length? A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Medicina (Kaunas).* 2022;58(2):242.
 53. Osorio-Yáñez C, Clemente DBP, Maitre L, Vives-Usano M, Bustamante M, Martinez D, et al. Early life tobacco exposure and children’s telomere length: The HELIX project. *Sci Total Environ.* 2020;711:135028.
 54. Valera-Gran D, Prieto-Botella D, Hurtado-Pomares M, Baladia E, Petermann-Rocha F, Sánchez-Pérez A, et al. The Impact of Foods, Nutrients, or Dietary Patterns on Telomere Length in Childhood and Adolescence: A Systematic Review. *Nutrients.* 2022;14(19):3885.
 55. Clemente DBP, Vrijheid M, Martens DS, Bustamante M, Chatzi L, Danileviciute A, et al. Prenatal and Childhood Traffic-Related Air Pollution Exposure and Telomere Length in European Children: The HELIX Project. *Environ Health Perspect.* 2019;127(8):87001.
 56. Kahrizi MS, Patra I, Jalil AT, Achmad H, Alesaeidi S, Al-Gazally ME, et al. Leukocyte telomere length and obesity in children and adolescents: A systematic review and meta-analysis. *Front Genet.* 2022;13:861101.
 57. Petermann-Rocha F, Valera-Gran D, Fernández-Pires P, Martens DS, Júlvez J, Rodríguez-Dehli C, et al. Children who sleep more may have longer telomeres: evidence from a longitudinal population study in Spain. *Pediatr Res.* 2022.
 58. Miri M, de Prado-Bert P, Alahabadi A, Najafi ML, Rad A, Moslem A, et al. Association of greenspace exposure with telomere length in preschool children. *Environmental Pollution.* 2020;266:115228.
 59. Chelombitko MA. Role of Reactive Oxygen Species in Inflammation: A Minireview. *Moscow Univ BiolSci Bull.* 2018;73(4):199–202.
 60. Piercy KL, Troiano RP, Ballard RM, Carlson SA, Fulton JE, Galuska DA, et al. The Physical Activity Guidelines for Americans. *JAMA.* 2018;320(19):2020–8.
 61. WHO guidelines on physical activity and sedentary behaviour [Internet]. [cited 2021 Sep 2]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240015128>
 62. Blümchen MJ and KS and G. Metabolic equivalents (METS) in exercise testing, exercise prescription, and evaluation of functional capacity | EndNote Click [Internet]. [cited 2023 Feb 28]. Available from: https://click.endnote.com/viewer?doi=10.1002%2Fcl.4960130809&token=WzMyMDIwOTgsIjEwLjEwMDIvY2xjLjQ5NjAxMzA4MDkiXQ.cR0qoKCP24pNhRukgOWN_S1RAKU

63. Poitras VJ, Gray CE, Borghese MM, Carson V, Chaput JP, Janssen I, et al. Systematic review of the relationships between objectively measured physical activity and health indicators in school-aged children and youth. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2016;41(6 Suppl 3):S197-239.
64. Carson V, Hunter S, Kuzik N, Gray CE, Poitras VJ, Chaput JP, et al. Systematic review of sedentary behaviour and health indicators in school-aged children and youth: an update. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2016;41(6 Suppl 3):S240-265.
65. Janssen I, Leblanc AG. Systematic review of the health benefits of physical activity and fitness in school-aged children and youth. *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2010;7:40.
66. Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep.* 1985;100(2):126–31.
67. Pozuelo-Carrascosa DP, Cavero-Redondo I, Herráiz-Adillo Á, Díez-Fernández A, Sánchez-López M, Martínez-Vizcaíno V. School-Based Exercise Programs and Cardiometabolic Risk Factors: A Meta-analysis. *Pediatrics.* 2018;142(5):e20181033.
68. Eddolls WTB, McNarry MA, Stratton G, Winn CON, Mackintosh KA. High-Intensity Interval Training Interventions in Children and Adolescents: A Systematic Review. *Sports Med.* 2017;47(11):2363–74.
69. Recchia F, Bernal JDK, Fong DY, Wong SHS, Chung PK, Chan DKC, et al. Physical Activity Interventions to Alleviate Depressive Symptoms in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Pediatrics.* 2023;177(2):132–40.
70. Philippot A, Meerschaut A, Danneaux L, Smal G, Bleyenheuft Y, De Volder AG. Impact of Physical Exercise on Symptoms of Depression and Anxiety in Pre-adolescents: A Pilot Randomized Trial. *Front Psychol.* 2019;10:1820.
71. Schuch FB, Deslandes AC, Stubbs B, Gosmann NP, Silva CTB da, Fleck MP de A. Neurobiological effects of exercise on major depressive disorder: A systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 2016;61:1–11.
72. Sember V, Jurak G, Kovač M, Morrison SA, Starc G. Children's Physical Activity, Academic Performance, and Cognitive Functioning: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Public Health* [Internet]. 2020 [cited 2023 Feb 23];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2020.00307>
73. Kramer AF, Erickson KI. Capitalizing on cortical plasticity: influence of physical activity on cognition and brain function. *Trends Cogn Sci.* 2007;11(8):342–8.
74. Vandekerckhove K, Coomans I, Moerman A, De Wolf D, Boone J. Characterizing cerebral and locomotor muscle oxygenation to incremental ramp exercise in healthy children: relationship with pulmonary gas exchange. *Eur J Appl Physiol.* 2016;116(11–12):2345–55.
75. Gorski T, De Bock K. Metabolic regulation of exercise-induced angiogenesis. *Vasc Biol.* 2019;1(1):H1–8.
76. Chaddock L, Erickson KI, Prakash RS, VanPatter M, Voss MW, Pontifex MB, et al. Basal Ganglia Volume Is Associated with Aerobic Fitness in Preadolescent Children. *Developmental Neuroscience.* 2010;32(3):249.

77. Batista MB, Romanzini CLP, Barbosa CCL, Blasquez Shigaki G, Romanzini M, Ronque ERV. Participation in sports in childhood and adolescence and physical activity in adulthood: A systematic review. *Journal of Sports Sciences*. 2019;37(19):2253–62.
78. World Health Organization. Global action plan on physical activity 2018–2030: more active people for a healthier world [Internet]. World Health Organization; 2018 [cited 2022 Feb 8]. 101 p. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272722>
79. Guthold R, Stevens GA, Riley LM, Bull FC. Global trends in insufficient physical activity among adolescents: a pooled analysis of 298 population-based surveys with 1.6 million participants. *The Lancet Child & Adolescent Health*. 2020;4(1):23–35.
80. Aubert S, Barnes JD, Abdeta C, Abi Nader P, Adeniyi AF, Aguilar-Farias N, et al. Global Matrix 3.0 Physical Activity Report Card Grades for Children and Youth: Results and Analysis From 49 Countries. *J Phys Act Health*. 2018;15(S2):S251–73.
81. Bauman A, Phongsavan P, Schoeppe S, Owen N. Physical activity measurement--a primer for health promotion. *Promot Educ*. 2006;13(2):92–103.
82. Mindell JS, Coombs N, Stamatakis E. Measuring physical activity in children and adolescents for dietary surveys: practicalities, problems and pitfalls. *Proc Nutr Soc*. 2014;73(2):218–25.
83. Sylvia LG, Bernstein EE, Hubbard JL, Keating L, Anderson EJ. A Practical Guide to Measuring Physical Activity. *J Acad Nutr Diet*. 2014;114(2):199–208.
84. Haskell WL. Physical activity by self-report: a brief history and future issues. *J Phys Act Health*. 2012;9 Suppl 1:S5-10.
85. Hidding LM, Chinapaw MaiJM, van Poppel MNM, Mokkink LB, Altenburg TM. An Updated Systematic Review of Childhood Physical Activity Questionnaires. *Sports Med*. 2018;48(12):2797–842.
86. Phillips SM, Summerbell C, Hobbs M, Hesketh KR, Saxena S, Muir C, et al. A systematic review of the validity, reliability, and feasibility of measurement tools used to assess the physical activity and sedentary behaviour of pre-school aged children. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*. 2021;18(1):141.
87. Corder K, Ekelund U, Steele RM, Wareham NJ, Brage S. Assessment of physical activity in youth. *J Appl Physiol* (1985). 2008;105(3):977–87.
88. Telford A, Salmon J, Jolley D, Crawford D. Reliability and Validity of Physical Activity Questionnaires for Children: The Children's Leisure Activities Study Survey (CLASS). *Pediatric Exercise Science*. 2004;16(1):64–78.
89. Benítez-Porres J, López-Fernández I, Raya JF, Álvarez Carnero S, Alvero-Cruz JR, Álvarez Carnero E. Reliability and Validity of the PAQ-C Questionnaire to Assess Physical Activity in Children. *J Sch Health*. 2016;86(9):677–85.
90. Van der Ploeg HP, Merom D, Chau JY, Bittman M, Trost SG, Bauman AE. Advances in population surveillance for physical activity and sedentary behavior: reliability and validity of time use surveys. *Am J Epidemiol*. 2010;172(10):1199–206.
91. Martínez-Gómez D, Wärnberg J, Welk GJ, Sjöström M, Veiga OL, Marcos A. Validity of the Bouchard activity diary in Spanish adolescents. *Public Health Nutrition*. 2010;13(2):261–8.

92. Trost SG. Objective measurement of physical activity in youth: current issues, future directions. *Exerc Sport Sci Rev*. 2001;29(1):32–6.
93. Livingstone MBE. Heart-rate monitoring: the answer for assessing energy expenditure and physical activity in population studies? *British Journal of Nutrition*. 1997;78(6):869–71.
94. Arvidsson D, Fridolfsson J, Börjesson M. Measurement of physical activity in clinical practice using accelerometers. *J Intern Med*. 2019;286(2):137–53.
95. Migueles JH, Cadenas-Sanchez C, Ekelund U, Delisle Nyström C, Mora-Gonzalez J, Lof M, et al. Accelerometer Data Collection and Processing Criteria to Assess Physical Activity and Other Outcomes: A Systematic Review and Practical Considerations. *Sports Med*. 2017;47(9):1821–45.
96. McNamara E, Hudson Z, Taylor SJC. Measuring activity levels of young people: the validity of pedometers. *Br Med Bull*. 2010;95:121–37.
97. Schmidt MD, Blizzard LC, Venn AJ, Cochrane JA, Dwyer T. Practical Considerations When Using Pedometers to Assess Physical Activity in Population Studies. *Research Quarterly for Exercise and Sport*. 2007;78(3):162–70.
98. Semeraro MD, Smith C, Kaiser M, Levinger I, Duque G, Gruber HJ, et al. Physical activity, a modulator of aging through effects on telomere biology. *Aging (Albany NY)*. 2020 Jun;12(13):13803–23.
99. Ludlow AT, Witkowski S, Marshall MR, Wang J, Lima LCJ, Guth LM, et al. Chronic Exercise Modifies Age-Related Telomere Dynamics in a Tissue-Specific Fashion. *The Journals of Gerontology: Series A*. 2012;67(9):911–26.
100. Ludlow AT, Gratidão L, Ludlow LW, Spangenburg EE, Roth SM. Acute exercise activates p38 MAPK and increases the expression of telomere-protective genes in cardiac muscle. *Experimental Physiology*. 2017;102(4):397–410.
101. Werner C, Hanhoun M, Widmann T, Kazakov A, Semenov A, Pöss J, et al. Effects of Physical Exercise on Myocardial Telomere-Regulating Proteins, Survival Pathways, and Apoptosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;52(6):470–82.
102. Cherkas LF, Hunkin JL, Kato BS, Richards JB, Gardner JP, Surdulescu GL, et al. The Association Between Physical Activity in Leisure Time and Leukocyte Telomere Length. *Archives of Internal Medicine*. 2008;168(2):154–8.
103. Du M, Prescott J, Kraft P, Han J, Giovannucci E, Hankinson SE, et al. Physical Activity, Sedentary Behavior, and Leukocyte Telomere Length in Women. *Am J Epidemiol*. 2012;175(5):414–22.
104. Tucker LA. Physical activity and telomere length in U.S. men and women: An NHANES investigation. *Preventive Medicine*. 2017;100:145–51.
105. Werner CM, Hecksteden A, Morsch A, Zundler J, Wegmann M, Kratzsch J, et al. Differential effects of endurance, interval, and resistance training on telomerase activity and telomere length in a randomized, controlled study. *European Heart Journal*. 2019;40(1):34–46.
106. Schellnegger M, Lin AC, Hammer N, Kamolz LP. Physical Activity on Telomere Length as a Biomarker for Aging: A Systematic Review. *Sports Med Open*. 2022;8(1):111.

107. Zhu H, Wang X, Gutin B, Davis CL, Keeton D, Thomas J, et al. Leukocyte Telomere Length in Healthy White and Black Adolescents: Relations to Race, Sex, Adiposity, Adipokines and Physical Activity. *J Pediatr.* 2011;158(2):215–20.
108. Ojeda-Rodríguez A, Morell-Azanza L, Martín-Calvo N, Zalba G, Chueca M, Azcona-Sanjulian MC, et al. Association between favourable changes in objectively measured physical activity and telomere length after a lifestyle intervention in pediatric patients with abdominal obesity. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2021;46(3):205–12.
109. De Ruyter T, Martens DS, Bijmens EM, Nawrot TS, De Henauw S, Michels N. A multi-exposure approach to study telomere dynamics in childhood: A role for residential green space and waist circumference. *Environ Res.* 2022;213:113656.
110. Haapala EA, Väistö J, Ihalainen JK, Tomaselli González C, Leppänen MH, Veijalainen A, et al. Associations of physical activity, sedentary time, and diet quality with biomarkers of inflammation in children. *Eur J Sport Sci.* 2021;1–10.
111. Tremblay MS, Aubert S, Barnes JD, Saunders TJ, Carson V, Latimer-Cheung AE, et al. Sedentary Behavior Research Network (SBRN) – Terminology Consensus Project process and outcome. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity.* 2017;14(1):75.
112. Rodríguez-Ayllon M, Cadenas-Sánchez C, Estévez-López F, Muñoz NE, Mora-Gonzalez J, Migueles JH, et al. Role of Physical Activity and Sedentary Behavior in the Mental Health of Preschoolers, Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med.* 2019;49(9):1383–410.
113. Fang K, Mu M, Liu K, He Y. Screen time and childhood overweight/obesity: A systematic review and meta-analysis. *Child Care Health Dev.* 2019;45(5):744–53.
114. Biddle SJH, García Bengoechea E, Wiesner G. Sedentary behaviour and adiposity in youth: a systematic review of reviews and analysis of causality. *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2017;14(1):43.
115. Marker C, Gnambs T, Appel M. Exploring the myth of the chubby gamer: A meta-analysis on sedentary video gaming and body mass. *Soc Sci Med.* 2022;301:112325.
116. Hoare E, Skouteris H, Fuller-Tyszkiewicz M, Millar L, Allender S. Associations between obesogenic risk factors and depression among adolescents: a systematic review. *Obes Rev.* 2014;15(1):40–51.
117. Primack BA, Swanier B, Georgiopoulos AM, Land SR, Fine MJ. Association between media use in adolescence and depression in young adulthood: a longitudinal study. *Arch Gen Psychiatry.* 2009;66(2):181–8.
118. Ohannessian CM. Media Use and Adolescent Psychological Adjustment: An Examination of Gender Differences. *J Child Fam Stud.* 2009;18(5):582–93.
119. Belmon LS, van Stralen MM, Busch V, Harmsen IA, Chinapaw MJM. What are the determinants of children’s sleep behavior? A systematic review of longitudinal studies. *Sleep Med Rev.* 2019;43:60–70.
120. American Academy of Pediatrics. Committee on Public Education. American Academy of Pediatrics: Children, adolescents, and television. *Pediatrics.* 2001;107(2):423–6.

121. Tremblay MS, Leblanc AG, Janssen I, Kho ME, Hicks A, Murumets K, et al. Canadian sedentary behaviour guidelines for children and youth. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2011;36(1):59–64; 65–71.
122. Global recommendations on physical activity for health [Internet]. [cited 2023 Mar 15]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241599979>
123. Santaliestra-Pasías AM, Mouratidou T, Verbestel V, Bammann K, Molnar D, Sieri S, et al. Physical activity and sedentary behaviour in European children: the IDEFICS study. *Public Health Nutr*. 2014;17(10):2295–306.
124. Konstabel K, Veidebaum T, Verbestel V, Moreno LA, Bammann K, Tornaritis M, et al. Objectively measured physical activity in European children: the IDEFICS study. *Int J Obes (Lond)*. 2014;38 Suppl 2:S135-143.
125. López-Fernández J, López-Valenciano A, Mayo X, Liguori G, Lamb MA, Copeland RJ, et al. No changes in adolescent's sedentary behaviour across Europe between 2002 and 2017. *BMC Public Health*. 2021;21(1):784.
126. Mielgo-Ayuso J, Aparicio-Ugarriza R, Castillo A, Ruiz E, Avila JM, Aranceta-Bartrina J, et al. Sedentary behavior among Spanish children and adolescents: findings from the ANIBES study. *BMC Public Health*. 2017;17:94.
127. Hidding LM, Altenburg TM, Mokkink LB, Terwee CB, Chinapaw MJM. Systematic Review of Childhood Sedentary Behavior Questionnaires: What do We Know and What is Next? *Sports Med*. 2017;47(4):677–99.
128. Bryant MJ, Lucove JC, Evenson KR, Marshall S. Measurement of television viewing in children and adolescents: a systematic review. *Obesity Reviews*. 2007;8(3):197–209.
129. Loprinzi PD, Cardinal BJ. Measuring Children's Physical Activity and Sedentary Behaviors. *Journal of Exercise Science & Fitness*. 2011;9(1):15–23.
130. Rey-López JP, Ruiz JR, Ortega FB, Verloigne M, Vicente-Rodriguez G, Gracia-Marco L, et al. Reliability and validity of a screen time-based sedentary behaviour questionnaire for adolescents: The HELENA study. *Eur J Public Health*. 2012;22(3):373–7.
131. Higgins JPT, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ*. 2003;327(7414):557–60.
132. Aunger J, Wagnild J. Objective and subjective measurement of sedentary behavior in human adults: A toolkit. *Am J Hum Biol*. 2022;34(1):e23546.
133. Loprinzi PD. Leisure-Time Screen-Based Sedentary Behavior and Leukocyte Telomere Length: Implications for a New Leisure-Time Screen-Based Sedentary Behavior Mechanism. *Mayo Clin Proc*. 2015;90(6):786–90.
134. Edwards MK, Loprinzi PD. Sedentary behavior, physical activity and cardiorespiratory fitness on leukocyte telomere length. *Health Promot Perspect*. 2016;7(1):22–7.
135. Xue HM, Liu QQ, Tian G, Quan LM, Zhao Y, Cheng G. Television Watching and Telomere Length Among Adults in Southwest China. *Am J Public Health*. 2017;107(9):1425–32.
136. León-Latre M, Moreno-Franco B, Andrés-Esteban EM, Ledesma M, Laclaustra M, Alcalde V, et al. Sedentary lifestyle and its relation to cardiovascular risk factors, insulin resistance and inflammatory profile. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2014;67(6):449–55.

137. Gabel L, Ridgers ND, Gatta PAD, Arundell L, Cerin E, Robinson S, et al. Associations of sedentary time patterns and TV viewing time with inflammatory and endothelial function biomarkers in children. *Pediatric Obesity*. 2016;11(3):194–201.
138. Aubert G, Baerlocher GM, Vulto I, Poon SS, Lansdorp PM. Collapse of Telomere Homeostasis in Hematopoietic Cells Caused by Heterozygous Mutations in Telomerase Genes. *PLOS Genetics*. 2012;8(5):e1002696.
139. Guxens M, Ballester F, Espada M, Fernández MF, Grimalt JO, Ibarluzea J, et al. Cohort Profile: the INMA--INfancia y Medio Ambiente--(Environment and Childhood) Project. *Int J Epidemiol*. 2012;41(4):930–40.
140. Vrijheid M, Slama R, Robinson O, Chatzi L, Coen M, van den Hazel P, et al. The Human Early-Life Exposome (HELIX): Project Rationale and Design. *Environ Health Perspect*. 2014;122(6):535–44.
141. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310(20):2191–4.
142. Martens DS, Van Der Stukken C, Derom C, Thiery E, Bijmens EM, Nawrot TS. Newborn telomere length predicts later life telomere length: Tracking telomere length from birth to child- and adulthood. *EBioMedicine*. 2021;63:103164.
143. Martens DS, Janssen BG, Bijmens EM, Clemente DBP, Vineis P, Plusquin M, et al. Association of Parental Socioeconomic Status and Newborn Telomere Length. *JAMA Netw Open*. 2020;3(5):e204057.
144. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*. 2007;8(2):R19.
145. Study Design & Analysis [Internet]. Telomere Research Network. [cited 2022 Dec 21]. Available from: <https://trn.tulane.edu/resources/study-design-analysis/>
146. Ridley K, Ainsworth BE, Olds TS. Development of a Compendium of Energy Expenditures for Youth. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*. 2008;5(1):45.
147. Butte NF, Watson KB, Ridley K, Zakeri IF, McMurray RG, Pfeiffer KA, et al. A Youth Compendium of Physical Activities: Activity Codes and Metabolic Intensities. *Med Sci Sports Exerc*. 2018;50(2):246–56.
148. Crouter SE, Horton M, Bassett DR. Use of a 2-Regression Model for Estimating Energy Expenditure in Children. *Med Sci Sports Exerc*. 2012;44(6):1177–85.
149. Rowlands AV, Dawkins NP, Maylor B, Edwardson CL, Fairclough SJ, Davies MJ, et al. Enhancing the value of accelerometer-assessed physical activity: meaningful visual comparisons of data-driven translational accelerometer metrics. *Sports Medicine - Open*. 2019;5(1):47.
150. Aadland E, Andersen LB, Anderssen SA, Resaland GK. A comparison of 10 accelerometer non-wear time criteria and logbooks in children. *BMC Public Health*. 2018;18(1):323.
151. Scott JJ, Rowlands AV, Cliff DP, Morgan PJ, Plotnikoff RC, Lubans DR. Comparability and feasibility of wrist- and hip-worn accelerometers in free-living adolescents. *J Sci Med Sport*. 2017;20(12):1101–6.

152. Steene-Johannessen J, Hansen BH, Dalene KE, Kolle E, Northstone K, Møller NC, et al. Variations in accelerometry measured physical activity and sedentary time across Europe – harmonized analyses of 47,497 children and adolescents. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*. 2020;17(1):38.
153. Hildebrand M, Hansen BH, van Hees VT, Ekelund U. Evaluation of raw acceleration sedentary thresholds in children and adults. *Scand J Med Sci Sports*. 2017;27(12):1814–23.
154. Hildebrand M, VAN Hees VT, Hansen BH, Ekelund U. Age group comparability of raw accelerometer output from wrist- and hip-worn monitors. *Med Sci Sports Exerc*. 2014;46(9):1816–24.
155. Fairclough SJ, Noonan R, Rowlands AV, Van Hees V, Knowles Z, Boddy LM. Wear Compliance and Activity in Children Wearing Wrist- and Hip-Mounted Accelerometers. *Med Sci Sports Exerc*. 2016;48(2):245–53.
156. Vioque J, Gimenez-Monzo D, Navarrete-Muñoz EM, Garcia-de-la-Hera M, Gonzalez-Palacios S, Rebagliato M, et al. Reproducibility and Validity of a Food Frequency Questionnaire Designed to Assess Diet in Children Aged 4-5 Years. *PLoS One*. 2016;11(11):e0167338.
157. Monteiro CA, Cannon G, Levy R, Moubarac JC, Jaime P, Martins AP, et al. NOVA. The star shines bright. *World Nutrition*. 2016;7(1–3):28–38.
158. Notario-Barandiaran L, Valera-Gran D, Gonzalez-Palacios S, Garcia-de-la-Hera M, Fernández-Barrés S, Pereda-Pereda E, et al. High adherence to a mediterranean diet at age 4 reduces overweight, obesity and abdominal obesity incidence in children at the age of 8. *Int J Obes*. 2020;44(9):1906–17.
159. WHO child growth standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: methods and development [Internet]. [cited 2022 Feb 8]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/924154693X>
160. Bijmens EM, Zeegers MP, Derom C, Martens DS, Gielen M, Hageman GJ, et al. Telomere tracking from birth to adulthood and residential traffic exposure. *BMC Med*. 2017;15(1):205.
161. Maechler M, Rousseeuw P, Croux C, Todorov V, Ruckstuhl A, Salibian-Barrera M, et al. robustbase: Basic Robust Statistics. R package version 0.93-8. 2021; Available from: <http://robustbase.r-forge.r-project.org/>
162. Mickey RM, Greenland S. The impact of confounder selection criteria on effect estimation. *Am J Epidemiol*. 1989;129(1):125–37.
163. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res*. 1999;8(2):135–60.
164. Kim S. ppcor: An R Package for a Fast Calculation to Semi-partial Correlation Coefficients. *Commun Stat Appl Methods*. 2015;22(6):665–74.
165. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez JC, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*. 2011;12(1):77.
166. Laliberté E. metacor: Meta-Analysis of Correlation Coefficients [Internet]. 2019 [cited 2022 Feb 8]. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=metacor>

167. Shammass MA. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011;14(1):28–34.
168. Memme JM, Erlich AT, Phukan G, Hood DA. Exercise and mitochondrial health. *J Physiol*. 2021;599(3):803–17.
169. Sorriento D, Di Vaia E, Iaccarino G. Physical Exercise: A Novel Tool to Protect Mitochondrial Health. *Front Physiol*. 2021;12:660068.
170. Aon MA, Cortassa S, O'Rourke B. Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797(6–7):865–77.
171. Powers SK, Goldstein E, Schragger M, Ji LL. Exercise Training and Skeletal Muscle Antioxidant Enzymes: An Update. *Antioxidants*. 2023;12(1):39.
172. Jurk D, Wilson C, Passos JF, Oakley F, Correia-Melo C, Greaves L, et al. Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nat Commun*. 2014;5(1):4172.
173. Verswijveren SJJM, Salmon J, Daly RM, Gatta PAD, Arundell L, Dunstan DW, et al. Is replacing sedentary time with bouts of physical activity associated with inflammatory biomarkers in children? *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2021;31(3):733–41.
174. Adamo KB, Prince SA, Tricco AC, Connor-Gorber S, Tremblay M. A comparison of indirect versus direct measures for assessing physical activity in the pediatric population: a systematic review. *Int J Pediatr Obes*. 2009;4(1):2–27.
175. Sallis JF, Saelens BE. Assessment of physical activity by self-report: status, limitations, and future directions. *Res Q Exerc Sport*. 2000;71(2 Suppl):S1-14.
176. Cherney ID, London K. Gender-linked Differences in the Toys, Television Shows, Computer Games, and Outdoor Activities of 5- to 13-year-old Children. *Sex Roles*. 2006;54(9):717.
177. Corder K, van Sluijs EMF, McMinn AM, Ekelund U, Cassidy A, Griffin SJ. Perception Versus Reality: Awareness of Physical Activity Levels of British Children. *American Journal of Preventive Medicine*. 2010;38(1):1–8.
178. Corder K, Crespo NC, van Sluijs EMF, Lopez NV, Elder JP. Parent awareness of young children's physical activity. *Prev Med*. 2012;55(3):201–5.
179. Crespo NC, Corder K, Marshall S, Norman GJ, Patrick K, Sallis JF, et al. An examination of multilevel factors that may explain gender differences in children's physical activity. *J Phys Act Health*. 2013;10(7):982–92.
180. Huang YJ, Wong SHS, Salmon J. Reliability and validity of the modified Chinese version of the Children's Leisure Activities Study Survey (CLASS) questionnaire in assessing physical activity among Hong Kong children. *Pediatr Exerc Sci*. 2009;21(3):339–53.
181. Dinella LM, Weisgram ES. Gender-Typing of Children's Toys: Causes, Consequences, and Correlates. *Sex Roles*. 2018;79(5):253–9.

ANEXOS

Anexo 1 - Artículo científico correspondiente a la publicación I



Article

Sedentary Behaviour and Telomere Length Shortening during Early Childhood: Evidence from the Multicentre Prospective INMA Cohort Study

Daniel Prieto-Botella, Dries S. Martens, Desiree Valera-Gran, Mikel Subiza-Pérez, Adonina Tardón, Manuel Lozano, Maribel Casas, Mariona Bustamante, Alba Jimeno-Romero, Ana Fernández-Somoano et al.

Special Issue

Child Physical Activity and Health

Edited by

Prof. Dr. Wojciech Kolanowski





Article

Sedentary Behaviour and Telomere Length Shortening during Early Childhood: Evidence from the Multicentre Prospective INMA Cohort Study

Daniel Prieto-Botella ^{1,†} , Dries S. Martens ², Desiree Valera-Gran ^{1,3,4,*,†} , Mikel Subiza-Pérez ^{5,6,7,8} , Adonina Tardón ^{9,10} , Manuel Lozano ^{11,12} , Maribel Casas ^{6,13,14}, Mariona Bustamante ^{6,13,14}, Alba Jimeno-Romero ¹⁵ , Ana Fernández-Somoano ^{6,9,10} , Sabrina Llop ^{6,11}, Martine Vrijheid ^{6,13,14}, Tim S. Nawrot ^{2,16} and Eva-María Navarrete-Muñoz ^{1,3,4}

- ¹ Department of Surgery and Pathology, Miguel Hernandez University, 03550 Alicante, Spain
 - ² Centre for Environmental Sciences, Hasselt University, Agoralaan Gebouw D, BE-3590 Hasselt, Belgium
 - ³ Grupo de Investigación en Terapia Ocupacional (InTeO), Miguel Hernández University, 03550 Alicante, Spain
 - ⁴ Alicante Institute for Health and Biomedical Research (ISABIAL-FISABIO Foundation), 03010 Alicante, Spain
 - ⁵ Biodonostia Health Research Institute, Group of Environmental Epidemiology and Child Development, 20014 San Sebastian, Spain
 - ⁶ Spanish Consortium for Research on Epidemiology and Public Health (CIBERESP), 28029 Madrid, Spain
 - ⁷ Department of Clinical and Health Psychology and Research Methods, University of the Basque Country (UPV/EHU), 20018 Donostia-San Sebastián, Spain
 - ⁸ Bradford Institute for Health Research, Temple Bank House, Bradford Royal Infirmary, Duckworth Lane, Bradford BD9 6RJ, UK
 - ⁹ Unidad de Epidemiología Molecular del Cáncer, Departamento de Medicina, Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Universidad de Oviedo, Julián Clavería Street s/n, 33006 Oviedo, Spain
 - ¹⁰ Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Roma Avenue s/n, 33001 Oviedo, Spain
 - ¹¹ Epidemiology and Environmental Health Joint Research Unit, FISABIO-Universitat Jaume I-Universitat de València, 46020 Valencia, Spain
 - ¹² Preventive Medicine and Public Health, Food Sciences, Toxicology and Forensic Medicine Department, Universitat de València, 46100 Valencia, Spain
 - ¹³ ISGlobal, Institute for Global Health, 08003 Barcelona, Spain
 - ¹⁴ Universitat Pompeu Fabra (UPF), 08003 Barcelona, Spain
 - ¹⁵ Department of Preventive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine, University of the Basque Country (UPV/EHU), 48940 Leioa, Spain
 - ¹⁶ Department of Public Health & Primary Care, University of Leuven (KU Leuven), BE-3000 Leuven, Belgium
- * Correspondence: dvalera@umh.es; Tel.: +34-965-233-705
† These authors have contributed equally to this work.



Citation: Prieto-Botella, D.; Martens, D.S.; Valera-Gran, D.; Subiza-Pérez, M.; Tardón, A.; Lozano, M.; Casas, M.; Bustamante, M.; Jimeno-Romero, A.; Fernández-Somoano, A.; et al. Sedentary Behaviour and Telomere Length Shortening during Early Childhood: Evidence from the Multicentre Prospective INMA Cohort Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2023**, *20*, 5134. <https://doi.org/10.3390/ijerph20065134>

Academic Editor: Wojciech Kolanowski

Received: 4 January 2023
Revised: 10 March 2023
Accepted: 13 March 2023
Published: 14 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Sedentary behaviour (SB) may be related to telomere length (TL) attrition due to a possible pro-inflammatory effect. This study examined the association between parent-reported sedentary behaviour (SB) and leukocyte TL at the age of 4 and telomere tracking from 4 to 8 years. In the Spanish birth cohort Infancia y Medio Ambiente (INMA) project, we analysed data from children who attended follow-up visits at age 4 ($n = 669$) and 8 ($n = 530$). Multiple robust regression models were used to explore the associations between mean daily hours of SB (screen time, other sedentary activities, and total SB) at 4 years categorised into tertiles and TL at 4 years and difference in TL rank between age 4 and 8, respectively. At the age of 4, the results showed that children with the highest screen time (1.6–5.0 h/day) had a shorter TL of -3.9% (95% CI: $-7.4, -0.4$; $p = 0.03$) compared with children in the lowest tertile (0.0–1.0 h/day). Between 4 and 8 years, a higher screen time (highest tertile group vs. lowest tertile) was associated with a decrease in the LTL rank of -1.9% (95% CI: $-3.8, -0.1$; $p = 0.03$) from 4 to 8 years. Children exposed to a higher screen time at 4 years were more prone to have shorter TL at 4 and between 4 and 8 years of age. This study supports the potential negative effect of SB during childhood on cellular longevity.

Keywords: lifestyle; children; genetics; screen time; epigenetics; cellular longevity

1. Introduction

Telomeres are DNA–protein complexes located at the end of chromosomes consisting of tandem-repeated TTAGGG sequences that maintain chromosome stability and integrity [1,2]. However, due to the end replication problem of cell division, full DNA replication cannot be completed, leading to a progressive natural telomere attrition [2]. In addition, telomeres can be vulnerable to oxidative stress and systemic inflammation induced by exogenous factors that can accelerate telomere length (TL) shortening [3,4]. As a biomarker of cellular aging, [5] a reduced TL has been associated with all-cause mortality and age-related diseases, including cardiovascular pathologies [6–8]. Non-genetic factors that can alter the oxidative stress and inflammation balance, including environmental exposures, have been associated with shorter TL in newborns, children, and adults [9–11]. In recent years, several studies have shown that unhealthy lifestyles, such as sedentary behaviour (SB) in adults, can negatively affect TL [12–14].

SB is defined as any waking activity with an energy expenditure ≤ 1.5 metabolic equivalent of task (MET), such as watching TV or reading [15]. In children and adolescents, SB has been associated with an increased risk of obesity, cardiometabolic diseases, or psychological ill-being [16,17]. Biologically, a sedentary lifestyle could induce significant pro-inflammatory effects [18–20], although the underlying mechanisms still need to be clarified.

To date, no evidence for the effect of SB on TL has been shown during childhood and/or adolescence. Alternatively, few studies have examined the association, although indirectly, between physical activity (PA) and TL in young populations. The study conducted by Zhu et al. reported that vigorous PA could have a beneficial effect on TL in adolescents aged 14–18 years [21]. More recently, a randomised clinical trial in obese children aged 7–16 years showed that light PA and sedentary time were inversely associated with TL [22]. Although these results are consistent with earlier evidence for adults, the available research on TL shortening factors during childhood is still very incipient. Importantly, since TL attrition in early life has been shown as predictor of later life TL, [23] studying the environmental factors that can affect TL in paediatric populations remain crucial for understanding age-related disease in adulthood [24].

Therefore, this study had the following aims: first, to examine the cross-sectional association between parent-reported SB at the age of 4 and leukocyte TL in 4-year-old children, and second, to explore the association between parent-reported SB at 4 years and telomere tracking from 4 to 8 years. We hypothesised that higher mean daily hours of SB at age 4 would be associated with a shorter TL at the same age and a decrease in the TL rank between 4 and 8 years of age.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

This study was performed using data from the birth cohort study INMA (Infancia y Medio Ambiente, <https://www.proyectoinma.org/>). Details of the INMA study protocol have been described elsewhere [25]. Briefly, 1909 women with singleton pregnancy were recruited between 2003 and 2008 in three areas of Spain (Asturias, Gipuzkoa, and Sabadell). A sample of 1383 (72.4%) mother–child pairs were evaluated at the 4-year follow-up visit after delivery, accounting for the baseline population of the present study. In addition, a second follow-up visit was performed at 7 years in Asturias and Gipuzkoa and at 9 years in Sabadell. From now on, we refer to this second visit as the 8-year assessment. Based on the available data on the child’s SB and TL, a total of 669 children participated at the 4-year follow-up and 530 children participated at the 8-year assessment. The flowchart of the population sample included in this study is displayed in Figure S1 (Supplementary Material). This study was approved by the regional Ethical Committees and a written informed consent was obtained from all participants at each phase of the study. This study complies with the Helsinki declaration for human studies [26].

2.2. Parent-Reported Sedentary Behaviour

Parent-reported SB information was collected by a questionnaire based on the Children's Leisure Activities Study Survey (CLASS) [27]. Parents were asked how many hours their child spent during weekdays and weekends watching TV/videos (screen time) and doing other sedentary activities (e.g., puzzles, books, dolls, homework, computer/videogames) outside school. Mean daily hours of screen time and other sedentary activities were calculated by averaging the time spent in these activities during weekdays and weekends as follows: $((\text{SB time weekday} \times 5) + (\text{SB time weekend} \times 2))/7$. Once mean daily hours of screen time and other sedentary activities were estimated for each child, we calculated the total SB as the sum of these two variables. All SB variables (i.e., screen time, other sedentary activities, and total SB) were categorised into tertiles to classify the children according to low, middle, or high SB.

2.3. Blood Collection and DNA Extraction

Child blood samples were collected during clinical examination and properly stored in EDTA tubes. At 4 years, DNA was extracted from whole blood using the Flexigen AGKT-WB-640 (Qiagen) kit in Gipuzkoa samples, Chemagen kit (Perkin Elmer) in Sabadell, and from buffy coat applying the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) in Asturias. At 8 years, DNA was extracted from buffy coat using the above-mentioned kits.

2.4. Leukocyte Telomere Length Measurement

Technical details on leucocyte TL measurement using qPCR [23] are described in Methods S1 (Supplementary Material). Telomeres were measured in triplicates, and on each run, a 6-point serial dilution of a pooled DNA ($n = 12$ DNA samples) was run to evaluate qPCR efficiency for telomere (T) and single-copy gene (S) runs. The efficiency was 107% for T runs (R^2 ranged from 0.995 to 0.999). Leucocyte TL at 8 years in the Sabadell cohort samples was assayed previously [28] using different single-copy gene primers (see Supplementary Material for more details). Relative leucocyte TL was calculated separately for each cohort using qBase software (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium). In qBase, TL is calculated as a calibrated normalised relative quantity (CNRQ) [29]. The latter is achieved by first calculating the RQ based on the delta-C_q method for T and S obtained C_q values, using target specific amplification efficiencies. As the choice of a calibrator sample (sample to which subsequent normalisation is performed) strongly influences the error on the final relative quantities (as a result of the measurement error on the calibrator sample), normalisation is performed to the arithmetic mean quantification values for all analysed samples per cohort, which results in the NRQ. Finally, as samples per cohort are measured over multiple qPCR plates, 8 inter-run calibrators (IRCs) are used to calculate an additional correction factor to eliminate run-to-run differences, resulting into the final T/S ratio (CNRQ). Mathematical calculation formulas to obtain RQ, NRQ, and CNRQs are provided by Hellemans et al., 2007 [29]. On each run, the reliability/accuracy of the applied protocol was assessed by calculating the intraclass correlation coefficients (ICC) of triplicate measures for T values (0.957; 95% CI: 0.954–0.96; $p < 0.0001$), S values (0.968; 95% CI: 0.965–0.97; $p < 0.0001$), and T/S ratio's (0.925; 95% CI: 0.918–0.93; $p < 0.0001$), using the ICC R-code provided by the Telomere Research Network [30]. In addition, based on the 8 IRCs ran over all the qPCR plates, an inter-assay ICC was calculated (0.898; 95% CI: 0.77–0.948; $p < 0.0001$). Based on the standard curves, qPCR efficiency for T runs was 107 on average.

2.5. Study Covariates

Covariates included data collected during pregnancy or at birth: child's sex (male or female), cohort (Asturias, Gipuzkoa, or Sabadell), preterm birth (no or yes), mother's periconceptional body mass index (BMI, calculated as weight in kilograms (kg) divided by height in meters squared (m²)), mother's country of origin (Spain or other) and mother's educational level (primary or less, secondary school, or university). At the 4 years follow-up

interview, the following was collected: child's characteristics (age (years)), BMI (kg/m²), blood extraction date, season of blood extraction (spring, summer, autumn, or winter), total energy intake (in kilocalories (kcal) per day), ultra-processed food intake according to the NOVA classification (grams (g) per day) [31], relative Mediterranean diet (rMed) score [32], extracurricular PA (MET-hours per day) [33], and mother's characteristics (age (years) and smoking status (yes or no)). Child nutritional data were assessed using a food frequency questionnaire previously validated in Spanish children [34]. Follow-up time was defined as the interval between the child's age at the baseline and age at the visit assessment at 8 years.

2.6. Statistical Analysis

R software version 4.1.0 (R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <http://www.R-project.org>) was used to conduct the statistical analyses. All applied statistical tests were bilateral, and the significance level was established at 0.05. Distribution of the continuous variables was checked using the Kolmogorov–Smirnov test. Mother and child characteristics were described according to the children's total SB time tertiles and compared using the ANOVA, Kruskal–Wallis, and Chi-square tests.

Multiple robust linear regression models using the robustbase R package [35] were conducted separately to explore the associations with TL at 4 years and changes in TL ranking from 4 to 8 years. To control potential confounding, several models were fitted by including all covariates with $p < 0.2$ in the bivariate analysis and those that changed the magnitude of main effect by 10% after a backward–forward elimination procedure [36]. In the cross-sectional analysis at 4 years of age, the association between SB and TL was explored using log-level regression models, where TL was log₁₀-transformed. Three different models were fitted for this analysis: Model 1 was adjusted for blood storage date and cohort; Model 2 included variables of Model 1 plus child's daily total energy intake, daily ultra-processed food intake, and age at baseline; and Model 3 included variables of Model 2 plus child's sex. Final estimates were presented as percentage (%) change in TL. Since TL at 8 years in children from Sabadell was measured using different single-copy genes, the values of TL at baseline (i.e., 4 years) were not directly comparable to those at follow-up (i.e., 8 years). Therefore, to evaluate the association between SB at 4 years and changes in TL from 4 to 8 years, we used a ranking method for examining telomere tracking [37]. Firstly, we ranked TL at 4 and 8 years separately by cohort from the longest to the shortest value (coded from 1 to n). The Spearman's correlation between 4- and 8-year TL ranking was 0.58 ($p < 0.001$). Secondly, we calculated the difference in telomere rank for each child between periods. The following formula was used to calculate the difference in telomere ranking (ΔR):

$$\Delta R = \frac{(R_1 - R_2)}{\left(\frac{n-1}{100}\right)} \quad (1)$$

where n is the sample size, R_1 is the baseline rank, and R_2 is the follow-up rank. Due to the difference in telomere ranking, which is directly determined by the sample size, we transformed it into a value of 100 to ease the interpretation in percentage terms. We explored the association with TL ranking using four different models. Models 1, 2, and 3 were equally adjusted for the variables used in the cross-sectional analysis. Model 4 was additionally adjusted for the follow-up time and TL at baseline (i.e., 4 years). Final estimates were provided as % change in ranking, where a negative value indicated a decline in telomere ranking as a relative change between TL at 4 years and 8 years.

To quantify the heterogeneity among the study cohorts, all associations were initially analysed using meta-analytic techniques to obtain combined estimates. The heterogeneity was quantified using I^2 statistics [36,38] with the meta R package [39]. Since all I^2 values obtained for the main outcomes were $< 50\%$, we performed the analysis adding the cohort variable to the adjustment of all the models.

Several sensitivity analyses were also conducted to examine the robustness of the main findings. Using Model 3 and Model 4 as the main models for the association with TL at 4 years and with TL ranking from 4 to 8 years, respectively, we separately explored the effect of the following child variables: other sedentary activities, rMed score, BMI, season of blood extraction, and extracurricular PA. In addition, mother variables such as periconceptional BMI, smoking status at baseline, and educational level were added jointly. We also examined whether the associations changed substantially according to the child's sex. Finally, we conducted an analysis excluding children born preterm.

3. Results

3.1. Characteristics of the Study Population

Table 1 describes the general characteristics of the study population by the total SB time tertiles. A total of 350 children (52.3%) were boys and the median (IQR) of BMI was 16.0 (15.2–17.0) kg/m². The mean (SD) of age was 4.4 (0.2) and 8.5 (0.6) years at baseline and follow-up, respectively. Overall, children spent a total of 2.6 (2.0–3.6) h/day in SB. Children located in the highest total SB tertile showed higher daily energy (1616 kcal.; 95% CI: 1453, 1862) and UPF (417 g; 95% CI: 291, 576) intakes. In addition, children grouped into the middle and high tertiles of total SB presented lower extracurricular PA (9.3 MET-h/day; 95% CI: 6.6, 12.4 and 9.5 MET-h/day; 95% CI: 6.5, 12.5, respectively) compared with the lowest tertile. Regarding maternal characteristics, women had a mean age at baseline of 37.1 (4.2) years, and a median (IQR) periconceptional BMI of 22.9 (20.9–25.5) kg/m². The vast majority were mothers born in Spain (94.0%) and 39.6% had studied at university. However, mothers whose children were in the highest total SB time tertile had greater rates of primary or secondary studies compared to those whose children were in the other tertiles. The comparison of mother and child characteristics before and after participant selection is provided in Table S1 (Supplementary Materials).

3.2. Sedentary Behaviour and Telomere Length at the Age of 4

In both minimal adjusted and fully adjusted models, daily screen time was negatively associated with TL in children at the age of 4 (Table 2). Compared to children with lower daily screen time, those who spent from 1.1 to 1.5 hr/day and from 1.6 to 5.0 h/day watching TV/videos showed a shorter TL (−3.3; 95% CI: −6.7, 0.4; $p = 0.07$ and −3.9; 95% CI: −7.4, −0.4; $p = 0.03$, respectively). Estimates for children in the middle tertile of other sedentary activities and those with middle and high total SB did not reach statistical significance.

3.3. Association between Sedentary Behaviour at 4 Years and Telomere Length Ranking from 4 to 8 Years

The association between SB variables at the age of 4 and telomere ranking from 4 to 8 years is shown in Table 2. An increased screen time was generally associated with a reduction in the TL ranking between 4 and 8 years of age, although the main results were observed after applying the fully adjusted model including the relevant variables besides the follow-up time and TL at baseline (Model 4). Children in the highest tertile of daily screen time presented a downward (accelerated shortening) shift in TL ranking of −1.9% (95% CI: −3.8, −0.1; $p = 0.03$) compared to those situated in the lowest tertile. No association was observed for other sedentary activities and total SB.

3.4. Sensitivity Analysis

Figure 1 shows the sensitivity analyses for the associations between high daily screen time and TL at 4 years and TL ranking from 4 to 8 years. The association of high screen time with TL at 4 years increased substantially when excluding the boys (−5.7; 95% CI: −10.6, −0.5), although it slightly dropped when excluding the girls (−3.4; 95% CI: −8.3, 1.7). However, we found no statistically significant interaction term between screen time vs. child's sex ($p \geq 0.2$). The effect of high screen time on TL ranking from the age of 4 to 8 was slightly reinforced when adjusting for mother's characteristics (−2.3; 95% CI: −4.1,

−0.4) and when excluding girls (−2.3; 95% CI: −4.6, 0.0). Our findings remained robust after excluding or adjusting for other relevant potential variables.

Table 1. Characteristics of mother–child pairs from the INMA study according to total sedentary time tertiles (h/day) at the age of 4 years.

Characteristics	Total	Tertiles of Total Sedentary Time			<i>p</i> ^a
		Low (0.0–2.2)	Middle (2.3–3.1)	High (3.2–7.9)	
Number of participants, n (%)	669 (100)	223 (33.3)	226 (33.8)	220 (32.9)	
Child's characteristics at baseline ^b					
Age, years, mean (SD)	4.4 (0.2)	4.4 (0.2)	4.4 (0.2)	4.4 (0.2)	0.69
Age at follow-up, years, mean (SD) ^c	8.5 (0.6)	8.3 (0.6)	8.5 (0.6)	8.6 (0.7)	0.001
Sex, n (%)					0.31
Male	350 (52.3)	122 (54.7)	109 (48.2)	119 (54.1)	
Female	319 (47.7)	101 (45.3)	117 (51.8)	101 (45.9)	
Preterm birth, yes, n (%) ^d	30 (4.5)	7 (3.2)	13 (5.8)	10 (4.6)	0.41
BMI, kg/m ²	16.0 (15.2–17.0)	15.9 (15.1–16.9)	16.0 (15.4–17.1)	16.1 (15.2–17.0)	0.61
Energy intake, kcal/day	1583 (1390–1820)	1542 (1345–1751)	1593 (1394–1846)	1616 (1453–1862)	0.001
UPF intake, g/day	381 (279–554)	374 (269–516)	379 (280–563)	417 (291–576)	0.05
rMed score	9.0 (7.0–10.0)	9.0 (7.0–11.0)	9.0 (7.0–10.0)	8.0 (7.0–10.0)	0.16
Extracurricular PA, MET-h/day	9.7 (6.8–12.9)	10.0 (7.5–13.5)	9.3 (6.6–12.4)	9.5 (6.5–12.5)	0.02
Cohort, n (%)					< 0.001
Asturias	273 (40.8)	82 (36.8)	104 (46.0)	87 (39.5)	
Gipuzkoa	131 (19.6)	66 (29.6)	42 (18.6)	23 (10.5)	
Sabadell	265 (39.6)	75 (33.6)	80 (35.4)	110 (50.0)	
Season of blood extraction, n (%)					0.21
Winter	165 (24.7)	49 (22.0)	62 (27.4)	54 (24.5)	
Spring	177 (26.5)	56 (25.1)	64 (28.3)	57 (25.9)	
Summer	180 (26.9)	71 (31.8)	58 (25.7)	51 (23.2)	
Autumn	147 (21.9)	47 (21.1)	42 (18.6)	58 (26.4)	
Mothers' characteristics					
Age at baseline, years, mean (SD)	37.1 (4.2)	37.4 (4.0)	36.9 (4.0)	37.0 (4.4)	0.35
Country of origin, Spain, n (%) ^e	626 (94.0)	212 (95.5)	209 (92.9)	205 (93.6)	0.48
Periconceptual BMI, kg/m ²	22.9 (20.9–25.5)	22.3 (20.6–25.1)	23.2 (21.2–25.4)	22.9 (21.0–26.2)	0.07
Smoking status, n (%) ^d					0.59
Yes	161 (24.1)	50 (22.7)	53 (23.7)	58 (26.7)	
No	500 (74.7)	170 (77.3)	171 (76.3)	159 (73.3)	
Educational level, n (%) ^e					0.005
University	265 (39.6)	104 (46.6)	95 (42.0)	66 (30.4)	
Secondary	270 (40.4)	85 (38.1)	89 (39.4)	96 (44.2)	
Primary	131 (19.6)	34 (15.3)	42 (18.6)	55 (25.4)	

Abbreviations: h, hour; SD, standard deviation; BMI, body mass index; UPF, ultra-processed food; rMed, relative Mediterranean Diet; PA, physical activity; MET, metabolic equivalent of task. ^a Chi-squared, Kruskal–Wallis, or ANOVA tests across tertiles of total sedentary time; ^b Child's and mother's characteristics presented as median (IQR, interquartile range) unless otherwise indicated. ^c Data available for n = 530. ^d Data available for n = 661. ^e Data available for n = 666.

Table 2. Association between sedentary behaviour in tertiles (h/day) and telomere length at the age of 4 and changes in telomere ranking from 4 to 8 years.

Sedentary Behaviour	n	Model 1 ^a		Model 2 ^b		Model 3 ^c		Model 4 ^d	
		% Change (95% CI)	<i>p</i>	% Change (95% CI)	<i>p</i>	% Change (95% CI)	<i>p</i>	% Change (95% CI)	<i>p</i>
Association for TL at 4 years (n = 669) ^e									
Screen time									
Low (0.0–1.0)	271	Ref		Ref		Ref			
Middle (1.1–1.5)	184	−3.4 (−6.9, 0.1)	0.05	−3.7 (−7.1, −0.1)	0.04	−3.3 (−6.7, 0.4)	0.07	−	−
High (1.6–5.0)	214	−4.3 (−7.6, −0.9)	0.01	−4.6 (−7.9, −1.1)	0.01	−3.9 (−7.4, −0.4)	0.03	−	−
Other sedentary activities									
Low (0.0–1.0)	278	Ref		Ref		Ref			
Middle (1.1–1.5)	190	−2.1 (−5.5, 1.4)	0.22	−2.0 (−5.4, 1.5)	0.26	−2.4 (−5.8, 1.1)	0.17	−	−
High (1.6–4.4)	201	1.6 (−2.0, 5.3)	0.38	1.8 (−1.8, 5.5)	0.34	1.1 (−2.4, 4.8)	0.53	−	−
Total sedentary behaviour									
Low (0.0–2.2)	223	Ref		Ref		Ref			
Middle (2.3–3.1)	226	−2.1 (−5.7, 1.7)	0.27	−2.1 (−5.7, 1.7)	0.28	−2.4 (−6.0, 1.4)	0.20	−	−
High (3.2–7.9)	220	−2.2 (−5.7, 1.4)	0.22	−2.1 (−5.6, 1.5)	0.24	−2.1 (−5.6, 1.5)	0.25	−	−

Table 2. Cont.

Sedentary Behaviour	n	Model 1 ^a		Model 2 ^b		Model 3 ^c		Model 4 ^d	
		% Change (95% CI)	p	% Change (95% CI)	p	% Change (95% CI)	p	% Change (95% CI)	p
Association for TL ranking from 4 to 8 years (n = 530) ^f									
Screen time									
Low (0.0–1.0)	219	Ref		Ref		Ref		Ref	
Middle (1.1–1.5)	143	−0.4 (−2.4, 1.5)	0.65	−0.3 (−2.2, 1.6)	0.76	−0.4 (−2.3, 1.6)	0.71	−1.0 (−2.8, 0.9)	0.30
High (1.6–5.0)	168	−1.6 (−3.5, 0.3)	0.10	−1.3 (−3.2, 0.6)	0.18	−1.3 (−3.3, 0.6)	0.16	−1.9 (−3.8, −0.1)	0.03
Other sedentary activities									
Low (0.0–1.0)	227	Ref		Ref		Ref		Ref	
Middle (1.1–1.5)	152	0.7 (−1.1, 2.5)	0.43	0.7 (−1.0, 2.5)	0.41	0.8 (−1.0, 2.6)	0.37	0.7 (−1.1, 2.4)	0.45
High (1.6–4.4)	151	0.7 (−1.4, 2.8)	0.52	0.7 (−1.4, 2.8)	0.51	0.8 (−1.3, 2.9)	0.47	1.4 (−0.6, 3.3)	0.17
Total sedentary behaviour									
Low (0.0–2.2)	177	Ref		Ref		Ref		Ref	
Middle (2.3–3.1)	177	0.1 (−1.7, 2.0)	0.88	0.2 (−1.7, 2.1)	0.81	0.2 (1.6, 2.1)	0.80	−0.2 (−2.0, 1.6)	0.82
High (3.2–7.9)	176	0.5 (−1.5, 2.4)	0.63	0.6 (−1.4, 2.5)	0.56	0.6 (−1.4, 2.5)	0.57	0.2 (−1.6, 2.1)	0.79

^a Model 1: model adjusted for blood storage date and cohort (Asturias, Gipuzkoa, and Sabadell); ^b Model 2: Model 1+ additional adjustment for child’s total energy intake (kcal./day), ultra-processed food intake (g/day), and age at baseline (years). ^c Model 3: Model 2+ additional adjustment for child’s sex (male or female). ^d Model 4: Model 3+ additional adjustment for follow-up time (years) and baseline leucocyte telomere length. ^e The associations for TL at 4 years were estimated as % change in leucocyte telomere length compared to the reference group of sedentary behaviour (lowest tertile); ^f The associations for TL ranking from 4 to 8 years were estimated as % change in ranking, a negative difference in ranking means a decline in ranking compared with the reference group of sedentary behaviour (lowest tertile).

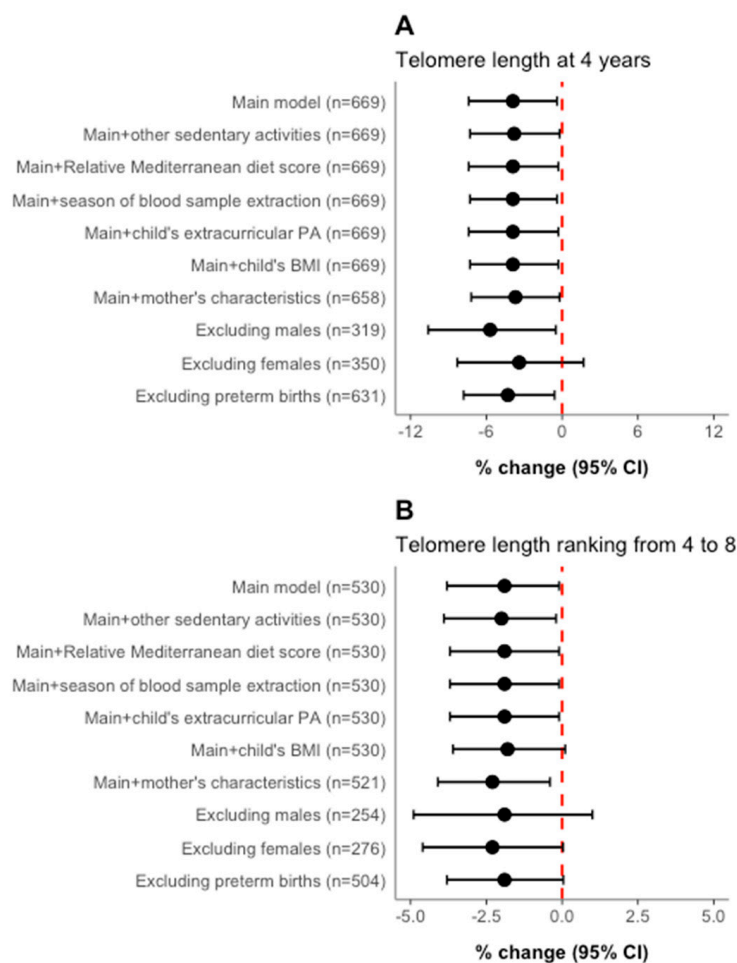


Figure 1. Sensitivity analyses for the associations between high screen time and telomere length at 4 years (A) and telomere length ranking from 4 to 8 years (B). Abbreviations: BMI, body mass index;

PA, physical activity. CI, confidence interval. Adjustment variables: other sedentary activities (low, middle, and high); relative Mediterranean diet score (rMed, continuous), season of blood sample extraction (spring, summer, autumn, or winter); child's extracurricular PA (METs-h/day) and child's BMI (kg/m²). Mother characteristics include the following: periconceptional BMI (kg/m²); smoking status at baseline (yes or no), and educational level (primary, secondary, or university). (A): Main model adjusted for blood storage time, cohort (Asturias, Gipuzkoa, and Sabadell), child's age (years), sex (male or female), energy intake (kcal/day), and ultra-processed food intake (g/day). The associations were estimated as % change in TL compared to the reference group (lowest tertile). (B): Main model adjusted for blood storage time, cohort (Asturias, Gipuzkoa, and Sabadell), child's age (years), sex (male or female), energy intake (Kcal/day), ultra-processed food intake (g/day), follow-up time (years), and baseline leucocyte telomere length. The estimates were expressed as % change in TL ranking compared with the reference group (lowest tertile).

4. Discussion

This study supports the fact that a higher screen time at 4 years is associated with a shorter TL at the same age and with a reduction in telomere ranking between the ages of 4 and 8. Although we observed that a general sedentary lifestyle also tended to have a negative effect on TL, the main findings disclosed that TL attrition during childhood was mainly due to a higher screen time after adjusting for relevant variables such as a child's BMI or extracurricular PA. Our findings are consistent with previous studies conducted in adults and, to our knowledge, this is the first time that this association has been reported at early ages. Moreover, it should be noted that the analysis for the TL ranking may suppose valuable evidence to reinforce the limited results obtained from the research on the child population.

To date, few studies have explored the relationship between lifestyle factors such as SB, PA, or TL in youth. A cross-sectional study conducted in 667 adolescents aged 14–18 years showed a positive association between vigorous PA and TL [21]. Similarly, a recent randomised clinical trial of a lifestyle intervention in 102 Spanish children (7–16 years) with abdominal obesity indicated that higher levels of PA were positively associated with TL, whereas SB and light PA showed a negative effect [22]. Based on these previous results, in this study, we examined whether a child's PA or BMI could be likely confounders of the detrimental effect of SB that we observed on TL. After accounting for these covariates, the estimates did not show changes, suggesting that the effect found for screen time was independent of them.

Several studies have suggested that a sedentary lifestyle could increase the concentration of pro-inflammatory cytokines and adipokines, incrementing chronic low-grade inflammation [13,19]. Although the underlying biological mechanism for the association between SB and TL shortening still needs to be clarified, a potential explanation may be attributed to the fact that a low-grade inflammatory state may affect telomere homeostasis, thus inducing TL shortening via oxidative stress [40]. Importantly, SB has been associated with the rise of pro-inflammatory biomarkers such as C-Reactive Protein (CRP), leptin, and interleukin-6 in children aged 6–8 years [41,42]. In addition, higher TV viewing time in 7–10-year-old children has been associated with greater levels of CRP and of sVCAM-1, a biomarker of endothelial dysfunction [43]. Biologically, the increment of pro-inflammatory biomarkers may induce an increase in apoptosis, cellular senescence, and oxidative stress, augmenting systemic inflammation and cellular aging, which are subsequently linked with TL shortening [44].

The results of this study are in accordance with cross-sectional studies conducted in the adult population. A study published by Xue and colleagues with 518 participants (20–70 years) showed that every hour/day spent watching TV was associated with an TL shortening of 72 base pairs [12]. In fact, results from the same study indicated that adults aged 20 to 40 in the highest tertile of daily screen time had a 4.0% shorter TL, which is similar to the results obtained in the present study (3.9% reduction in TL). Another study with 6405 adults (20–84 years) from the 1999–2002 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) observed that for every 1 h/day of screen-based SB, participants had

7% increased odds of having TL in the lowest tertile [13]. However, a later study based on the same data did not find an association between SB and TL [45]. In sum, although the available evidence seems to indicate that SB has a negative effect on TL, the results remain inconsistent, probably as a consequence of the different criteria used for the measurement of SB as well as resulting from other factors. More research is therefore needed to clarify the role of SB on cellular longevity.

Our study presents several strengths. First, the prospective design of the INMA project allowed us to verify the negative effects of SB on TL attrition observed at the age of 4 in a later assessment during childhood. Second, we included different types of SB that we examined as independent variables to account for possible differences in sedentary lifestyles, which may provide more support to the effect found for the screen time. Third, the main associations remained similar after applying the sensitivity analyses, reinforcing the findings' robustness. Finally, it should be noted that the study population size was considerably reduced after participant selection. However, there were no differences between the included and non-included participants, suggesting that a selection bias did not occur (Table S1 in the Supplementary Material).

However, our study should be interpreted within the context of its potential limitations. Our SB variables were assessed using a questionnaire based on the CLASS, which has not been validated in Spanish children. In this sense, although a potential misclassification may occur, it should be nondifferential. Regarding TL, different DNA extraction kits were used among cohorts. Additionally, TL at 8 years from the Sabadell cohort was measured with a slightly different qPCR methodology. Nevertheless, we minimised the impact of these variations by normalising the TL by cohort and using a ranking approach in the analysis.

5. Conclusions

To our knowledge, this is the first study to report a negative association between screen time and TL during childhood. Importantly, the negative effect of a higher screen time on TL observed at 4 years was prospectively confirmed in a reduction in telomere tracking from 4 to 8 years. This study supports the potential adverse effect of SB on human health and stresses the need for further prospective studies to confirm these results.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijerph20065134/s1>. Methods S1: Average relative telomere length measurement using qPCR; Table S1: Comparison of mother–child pairs characteristics before and after participant selection for cross-sectional and longitudinal analyses; Figure S1: Flow chart of participant selection; Figure S2: Distribution plot of telomere length in the study participants. Reference [46] is cited in Supplementary Materials.

Author Contributions: Conceptualisation, D.V.-G., E.-M.N.-M. and M.B.; methodology, D.V.-G., D.S.M. and E.-M.N.-M.; formal analysis, D.P.-B., D.S.M., D.V.-G. and E.-M.N.-M.; data curation, D.P.-B., D.S.M. and E.-M.N.-M.; writing—original draft preparation, D.P.-B. and D.V.-G.; writing—review and editing, D.P.-B., D.S.M., D.V.-G., M.S.-P., A.T., M.L., M.C., M.B., A.J.-R., A.F.-S., S.L., M.V., T.S.N. and E.-M.N.-M.; supervision, D.S.M., D.V.-G. and E.-M.N.-M.; project administration, E.-M.N.-M.; funding acquisition, D.V.-G., M.S.-P., M.L., M.C., M.B., S.L., M.V. and E.-M.N.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Instituto de Salud Carlos III/Agencia Estatal de Investigación (PI18/00825: “Dieta y actividad física en embarazo y tras el nacimiento y longitud del telómero en niños y adolescentes: Proyecto TeloDiPA” and European Regional Development Fund (ERDF): “Una manera de hacer Europa”); the Generalitat Valenciana (GVA/2021/191, CIAICO/2021/132); the Instituto de Salud Carlos III (FIS-PI09/00090, PI04/2018, PI09/02311, PI13/02429, PI16/1288, PI18/00909, PI19/1338 and FIS-PI18/01142 incl. ERFD funds, PS20/0006), the Department of Health of the Basque Government (2013111089); the Instituto de Salud Carlos III (FIS-PI13/02187 and FIS-PI18/01142 incl. ERFD funds), the Department of Health of the Basque Government (2015111065), and the Provincial Government of Gipuzkoa (DFG15/221) and annual agreements with the municipalities of the study area (Zumarraga, Urretxu, Legazpi, Azkoitia y Azpeitia y Beasain); Obra Social Cajasur/Fundación Liberbank and Universidad de Oviedo; and Gobierno de España through Ministerio

de Universidades under the grants CAS21/00008 and NextGenerationEU. DPB was supported by the Miguel Hernández University (Ayudas Movilidad Internacional 2021, Erasmus+ 2021) during the development of this study. In addition, DM holds a postdoctoral grant by the Flemish Scientific Fund (FWO grant 12X9620N). The funders had no role in the design of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, or approval and submission of the manuscript. The APC was funded by PI18/00825.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and was approved by the Ethics Committee of General Hospital of the Department of Health of Alicante (protocol code Acta 2019/07 and date of approval on 31 July 2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Blackburn, E.H. Structure and function of telomeres. *Nature* **1991**, *350*, 569–573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- O’Sullivan, R.J.; Karlseder, J. Telomeres: Protecting chromosomes against genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 171–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Reichert, S.; Stier, A. Does oxidative stress shorten telomeres in vivo? A review. *Biol. Lett.* **2017**, *13*, 20170463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kordinas, V.; Ioannidis, A.; Chatzipanagiotou, S. The Telomere/Telomerase System in Chronic Inflammatory Diseases. Cause or Effect? *Genes* **2016**, *7*, 60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Shammas, M.A. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2011**, *14*, 28–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wang, Q.; Zhan, Y.; Pedersen, N.L.; Fang, F.; Hägg, S. Telomere Length and All-Cause Mortality: A Meta-analysis. *Ageing Res. Rev.* **2018**, *48*, 11–20. [[CrossRef](#)]
- Fyhrquist, F.; Saijonmaa, O.; Strandberg, T. The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **2013**, *10*, 274–283. [[CrossRef](#)]
- Zhang, C.; Chen, X.; Li, L.; Zhou, Y.; Wang, C.; Hou, S. The Association between Telomere Length and Cancer Prognosis: Evidence from a Meta-Analysis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0133174. [[CrossRef](#)]
- Dugdale, H.L.; Richardson, D.S. Heritability of telomere variation: It is all about the environment! *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2018**, *373*, 20160450. [[CrossRef](#)]
- Ridout, K.K.; Levandowski, M.; Ridout, S.J.; Gantz, L.; Goonan, K.; Palermo, D.; Price, L.H.; Tyrka, A.R. Early life adversity and telomere length: A meta-analysis. *Mol. Psychiatry* **2018**, *23*, 858–871. [[CrossRef](#)]
- Azcona-Sanjulian, M.C. Telomere Length and Pediatric Obesity: A Review. *Genes* **2021**, *12*, 946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Xue, H.M.; Liu, Q.Q.; Tian, G.; Quan, L.M.; Zhao, Y.; Cheng, G. Television Watching and Telomere Length Among Adults in Southwest China. *Am. J. Public Health* **2017**, *107*, 1425–1432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Loprinzi, P.D. Leisure-Time Screen-Based Sedentary Behavior and Leukocyte Telomere Length: Implications for a New Leisure-Time Screen-Based Sedentary Behavior Mechanism. *Mayo Clin. Proc.* **2015**, *90*, 786–790. [[CrossRef](#)]
- Du, M.; Prescott, J.; Kraft, P.; Han, J.; Giovannucci, E.; Hankinson, S.E.; De Vivo, I. Physical Activity, Sedentary Behavior, and Leukocyte Telomere Length in Women. *Am. J. Epidemiol.* **2012**, *175*, 414–422. [[CrossRef](#)]
- Tremblay, M.S.; Aubert, S.; Barnes, J.D.; Saunders, T.J.; Carson, V.; Latimer-Cheung, A.E.; Chastin, S.F.M.; Altenburg, T.M.; Chinapaw, M.J.M. Sedentary Behavior Research Network (SBRN)—Terminology Consensus Project process and outcome. *Int. J. Behav. Nutr. Phys. Act.* **2017**, *14*, 75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Carson, V.; Hunter, S.; Kuzik, N.; Gray, C.E.; Poitras, V.J.; Chaput, J.-P.; Saunders, T.J.; Katzmarzyk, P.T.; Okely, A.D.; Gorber, S.C.; et al. Systematic review of sedentary behaviour and health indicators in school-aged children and youth: An update. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2016**, *41* (Suppl. 3), S240–S265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rodríguez-Ayllon, M.; Cadenas-Sánchez, C.; Estévez-López, F.; Muñoz, N.E.; Mora-Gonzalez, J.; Migueles, J.H.; Molina-García, P.; Henriksson, H.; Mena-Molina, A.; Martínez-Vizcaíno, V.; et al. Role of Physical Activity and Sedentary Behavior in the Mental Health of Preschoolers, Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med. Auckl. N. Z.* **2019**, *49*, 1383–1410. [[CrossRef](#)]
- Semeraro, M.D.; Smith, C.; Kaiser, M.; Levinger, I.; Duque, G.; Gruber, H.-J.; Herrmann, M. Physical activity, a modulator of aging through effects on telomere biology. *Ageing* **2020**, *12*, 13803–13823. [[CrossRef](#)]
- Friedenreich, C.M.; Ryder-Burbidge, C.; McNeil, J. Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: Epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Mol. Oncol.* **2021**, *15*, 790–800. [[CrossRef](#)]
- Rodas, L.; Riera-Sampol, A.; Aguilo, A.; Martínez, S.; Tauler, P. Effects of Habitual Caffeine Intake, Physical Activity Levels, and Sedentary Behavior on the Inflammatory Status in a Healthy Population. *Nutrients* **2020**, *12*, E2325. [[CrossRef](#)]

21. Zhu, H.; Wang, X.; Gutin, B.; Davis, C.L.; Keeton, D.; Thomas, J.; Stallmann-Jorgensen, I.; Mookken, G.; Bundy, V.; Snieder, H.; et al. Leukocyte Telomere Length in Healthy White and Black Adolescents: Relations to Race, Sex, Adiposity, Adipokines and Physical Activity. *J. Pediatr.* **2011**, *158*, 215–220. [CrossRef]
22. Ojeda-Rodríguez, M.A.; Morell-Azanza, L.; Martín-Calvo, N.; Zalba, G.; Chueca, M.; Azcona-Sanjulian, M.C.; Marti, A. Association between favourable changes in objectively measured physical activity and telomere length after a lifestyle intervention in pediatric patients with abdominal obesity. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2021**, *46*, 205–212. [CrossRef] [PubMed]
23. Martens, D.S.; Van Der Stukken, C.; Derom, C.; Thiery, E.; Bijmens, E.M.; Nawrot, T.S. Newborn telomere length predicts later life telomere length: Tracking telomere length from birth to child- and adulthood. *EBioMedicine* **2021**, *63*, 103164. [CrossRef]
24. Benetos, A.; Verhulst, S.; Labat, C.; Lai, T.; Girerd, N.; Toupan, S.; Zannad, F.; Rossignol, P.; Aviv, A. Telomere length tracking in children and their parents: Implications for adult onset diseases. *FASEB J.* **2019**, *33*, 14248–14253. [CrossRef]
25. Guxens, M.; Ballester, F.; Espada, M.; Fernández, M.F.; Grimalt, J.O.; Ibarluzea, J.; Olea, N.; Rebagliato, M.; Tardon, A.; Torrent, M.; et al. Cohort Profile: The INMA—Infancia y Medio Ambiente—(Environment and Childhood) Project. *Int. J. Epidemiol.* **2012**, *41*, 930–940. [CrossRef]
26. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* **2013**, *310*, 2191–2194. [CrossRef]
27. Telford, A.; Salmon, J.; Jolley, D.; Crawford, D. Reliability and Validity of Physical Activity Questionnaires for Children: The Children’s Leisure Activities Study Survey (CLASS). *Pediatr. Exerc. Sci.* **2004**, *16*, 64–78. [CrossRef]
28. Martens, D.S.; Janssen, B.G.; Bijmens, E.M.; Clemente, D.B.P.; Vineis, P.; Plusquin, M.; Nawrot, T.S. Association of Parental Socioeconomic Status and Newborn Telomere Length. *JAMA Netw. Open* **2020**, *3*, e204057. [CrossRef] [PubMed]
29. Hellemans, J.; Mortier, G.; De Paepe, A.; Speleman, F.; Vandesompele, J. QBase Relative Quantification Framework and Software for Management and Automated Analysis of Real-Time Quantitative PCR Data. *Genome Biol.* **2007**, *8*, R19. [CrossRef]
30. Telomere Research Network (TRN). Resources of Study Design & Analysis. Available online: <https://trn.tulane.edu/resources/study-design-analysis/> (accessed on 21 December 2022).
31. Monteiro, C.A.; Cannon, G.; Levy, R.; Moubarac, J.C.; Jaime, P.; Martins, A.P.; Canella, D.; Louzada, M. NOVA. The star shines bright. *World Nutr.* **2016**, *7*, 28–38.
32. Notario-Barandiaran, L.; Valera-Gran, D.; Gonzalez-Palacios, S.; Garcia-de-la-Hera, M.; Fernández-Barrés, S.; Pereda-Pereda, E.; Fernández-Somoano, A.; Guxens, M.; Iñiguez, C.; Romaguera, D.; et al. High adherence to a mediterranean diet at age 4 reduces overweight, obesity and abdominal obesity incidence in children at the age of 8. *Int. J. Obes.* **2020**, *44*, 1906–1917. [CrossRef] [PubMed]
33. Ridley, K.; Ainsworth, B.E.; Olds, T.S. Development of a Compendium of Energy Expenditures for Youth. *Int. J. Behav. Nutr. Phys. Act.* **2008**, *5*, 45. [CrossRef]
34. Vioque, J.; Gimenez-Monzo, D.; Navarrete-Muñoz, E.M.; Garcia-De-La-Hera, M.; Gonzalez-Palacios, S.; Rebagliato, M.; Ballester, F.; Murcia, M.; Iñiguez, C.; Granado, F.; et al. Reproducibility and Validity of a Food Frequency Questionnaire Designed to Assess Diet in Children Aged 4–5 Years. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0167338. [CrossRef] [PubMed]
35. Maechler, M.; Rousseeuw, P.; Croux, C.; Todorov, V.; Ruckstuhl, A.; Salibian-Barrera, M.; Verbeke, T.; Koller, M.; Conceicao, E.L.; Anna di Palma, M. Robustbase: Basic Robust Statistics. R Package Version 0.93-8. 2021. Available online: <http://robustbase.r-forge.r-project.org/> (accessed on 30 June 2021).
36. Mickey, R.M.; Greenland, S. The impact of confounder selection criteria on effect estimation. *Am. J. Epidemiol.* **1989**, *129*, 125–137. [CrossRef] [PubMed]
37. Bijmens, E.M.; Zeegers, M.P.; Derom, C.; Martens, D.S.; Gielen, M.; Hageman, G.J.; Plusquin, M.; Thiery, E.; Vlietinck, R.; Nawrot, T.S. Telomere tracking from birth to adulthood and residential traffic exposure. *BMC Med.* **2017**, *15*, 205. [CrossRef]
38. Higgins, J.P.T.; Thompson, S.G.; Deeks, J.J.; Altman, D.G. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ.* **2003**, *327*, 557–560. [CrossRef]
39. Balduzzi, S.; Rücker, G.; Schwarzer, G. How to perform a meta-analysis with R: A practical tutorial. *Evid. Based Ment. Health* **2019**, *22*, 153–160. [CrossRef]
40. Jurk, D.; Wilson, C.; Passos, J.F.; Oakley, F.; Correia-Melo, C.; Greaves, L.; Saretzki, G.; Fox, C.; Lawless, C.; Anderson, R.; et al. Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4172. [CrossRef]
41. Haapala, E.A.; Väistö, J.; Ihalainen, J.K.; González, C.T.; Leppänen, M.H.; Veijalainen, A.; Sallinen, T.; Eloranta, A.-M.; Ekelund, U.; Schwab, U.; et al. Associations of physical activity, sedentary time, and diet quality with biomarkers of inflammation in children. *Eur. J. Sport Sci.* **2021**, *22*, 906–915. [CrossRef]
42. Verswijveren, S.J.J.M.; Salmon, J.; Daly, R.M.; Della Gatta, P.A.; Arundell, L.; Dunstan, D.W.; Hesketh, K.D.; Cerin, E.; Ridgers, N.D. Is replacing sedentary time with bouts of physical activity associated with inflammatory biomarkers in children? *Scand. J. Med. Sci. Sports* **2021**, *31*, 733–741. [CrossRef]
43. Gabel, L.; Ridgers, N.D.; Della Gatta, P.A.; Arundell, L.; Cerin, E.; Robinson, S.; Daly, R.M.; Dunstan, D.W.; Salmon, J. Associations of sedentary time patterns and TV viewing time with inflammatory and endothelial function biomarkers in children. *Pediatr. Obes.* **2016**, *11*, 194–201. [CrossRef] [PubMed]
44. Fernandes, S.G.; Dsouza, R.; Khattar, E. External environmental agents influence telomere length and telomerase activity by modulating internal cellular processes: Implications in human aging. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2021**, *85*, 103633. [CrossRef] [PubMed]

45. Edwards, M.K.; Loprinzi, P.D. Sedentary behavior, physical activity and cardiorespiratory fitness on leukocyte telomere length. *Health Promot. Perspect.* **2016**, *7*, 22–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Cawthon, R.M. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Supplementary Material

Methods S1. Average relative telomere length measurement using qPCR.

Table S1. Comparison of mother–child pair characteristics before and after participant selection for cross-sectional and longitudinal analyses.

Figure S1. Flow chart of participant selection.

Figure S2. Distribution plot of telomere length in the study participants.

References.

This supplemental material has been provided by the authors to give readers additional information about their work.

Methods S1. Average relative telomere length measurement using qPCR.

Average relative telomere length was measured using a modified qPCR protocol in accordance with Cawthon et al. [1] that was reported by Martens and colleagues [2]. Firstly, DNA quantity and purity was assessed using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Isogen, Life Science, Belgium) considering the DNA pure when the A260/280 was greater than 1.80 and A260/230 greater than 2.0. DNA integrity was assessed by agarose gel-electrophoresis. To ensure a uniform DNA input of 5 ng for each qPCR reaction, samples were diluted and checked using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Life Technologies, Europe). All samples were measured in triplicates using a 7900HT Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems) in a 384-well format. The reaction mixture used to assess telomeres contained 1x QuantiTect SYBR Green PCR master mix (Qiagen, Inc., Venlo, the Netherlands), 2 mM dithiothreitol (DTT), 300 nM telg primer (ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGT TAGTGT), and 900 nM telc primer (TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACA). The applied cycling conditions were as follows: 1 cycle at 95°C for 10 min, 2 cycles at 94°C for 15 sec and 49°C for 2 min, and 30 cycles at 94°C for 15 sec, 62°C for 20 sec, and 74°C for 1 min and 40 sec. The single-copy gene (human β globin) qPCR mixture contained 1x QuantiTect SYBR Green PCR master mix, 400 nM HBG1 primer (GCTTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGC), and 400 nM HBG2 primer (CACCAACTTCATCCACGTTCCACC). The single-copy gene used in Sabadell samples at 8 years was different and contained 1x QuantiTect SYBR Green PCR master mix, 300 nM 36B4u primer (CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC), and 500 nM 36B4d primer (CCCATCTATCATCAACGG GTACAA) [3]. The same cycling conditions were used: 1 cycle at 95°C for 10 min, 40 cycles at 95°C for 15 sec, and 58°C for 1 min and 20 sec. After PCR cycling, individual qPCR curves and melt curves were visually inspected and when a run error was observed the Cq value was removed from subsequent analysis. In addition, when triplicate measures showed a deviation of more than 0.3 in Cq values, these were removed from subsequent analysis. In total, n= 6 samples did not meet these criteria.

Table S1. Comparison of mother–child pair characteristics before and after participant selection for cross-sectional and longitudinal analyses.

Table S1. Comparison of mother–child pair characteristics before and after participant selection for analyses at 4 years and 8 years.

Characteristic	Time ^a		
	Eligible at 4 years	Available at 4 years	Available at 8 years
Number of participants	1383	669	530
Child’s characteristics at 4 years ^b			
Age, years, mean (SD)	4.4 (0.2)	4.4 (0.2)	4.4 (0.2)
Sex, n (%)			
Male	713 (51.6)	350 (52.3)	276 (52.1)
Female	670 (48.4)	319 (47.7)	254 (47.9)
BMI, Kg/m ²	16.0 (15.2 to 17.0)	16.0 (15.2 to 17.0)	16.0 (15.3 to 16.9)
Missing, n (%)	5 (0.4)	0 (0.0)	0 (0.0)
Energy intake, kcal/day	1556 (1343 to 1793)	1583 (1390 to 1820)	1563 (1377 to 1798)
Missing, n (%)	68 (4.9)	0 (0.0)	0 (0.0)
UPF intake, g/day	397 (284 to 552)	381 (279 to 554)	380 (277 to 552)
Missing, n (%)	68 (4.9)	0 (0.0)	0 (0.0)
Fruits and vegetables intake, g/day	207 (145 to 295)	219 (155 to 304)	216 (153 to 305)
Missing, n (%)	68 (4.9)	0 (0.0)	0 (0.0)
Relative Mediterranean diet score	8.0 (7.0 to 10.0)	9.0 (7.0 to 10.0)	9.0 (7.0 to 11.0)
Missing, n (%)	68 (4.9)	0 (0.0)	0 (0.0)
Extracurricular PA, MET-hr/day	9.9 (7.0 to 13.1)	9.7 (6.8 to 12.9)	9.8 (7.1 to 12.9)
Missing, n (%)	38 (2.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
Cohort, n (%)			
Asturias	412 (29.8)	273 (40.8) ^c	194 (36.6) ^c
Gipuzkoa	412 (29.8)	131 (19.6)	123 (23.2)
Sabadell	559 (40.4)	265 (39.6)	213 (40.2)
Season of blood extraction, n (%)			
Winter	221 (16.0)	165 (24.7)	130 (24.5)
Spring	287 (20.8)	177 (26.5)	133 (25.1)
Summer	313 (22.6)	180 (26.9)	155 (29.2)
Autumn	264 (19.1)	147 (21.9)	112 (21.2)
Missing	298 (21.5)	0 (0.0)	0 (0.0)
Mothers’ Characteristics at 4 years			
Age, years, mean (SD)	36.7 (4.0)	37.1 (4.2)	37.2 (4.0)
Missing, n (%)	81 (5.9)	0 (0.0)	0 (0.0)
Country of origin, Spain, n (%)	1298 (94.4)	626 (94.0)	497 (94.0)
Missing, n (%)	8 (0.6)	3 (0.4)	0 (0.0)
Periconceptual BMI, kg/m ²	22.7 (20.8 to 25.2)	22.9 (20.9 to 25.5)	22.9 (20.8 to 25.3)
Missing, n (%)	13 (0.9)	0 (0.0)	0 (0.0)
Smoking status, n (%)			
Yes	314 (22.7)	161 (24.1)	120 (22.6)
No	1024 (74.0)	500 (74.7)	404 (76.2)
Missing	45 (3.3)	8 (1.2)	6 (1.2)
Educational level, n (%)			
University	557 (40.3)	265 (39.6)	218 (41.1)
Secondary	562 (40.6)	270 (40.4)	211 (39.8)
Primary	246 (17.8)	131 (19.6)	98 (18.5)
Missing	18 (1.3)	3 (0.4)	3 (0.6)

Abbreviations: hr, hour; SD, standard deviation; BMI, body mass index; UPF, ultra-processed food; PA, physical activity; MET, metabolic equivalent of task.

^a Differences between sample size available at 4 years vs. eligible at 4 years and available at 8 years vs. available at 4 years were assessed using ANOVA and chi-squared tests.

^b Child’s and mother’s characteristics presented as median (IQR, interquartile range) unless otherwise indicated.

^cP value < 0.05 vs. participants eligible at 4 years.

Figure S1. Flow chart of participant selection.

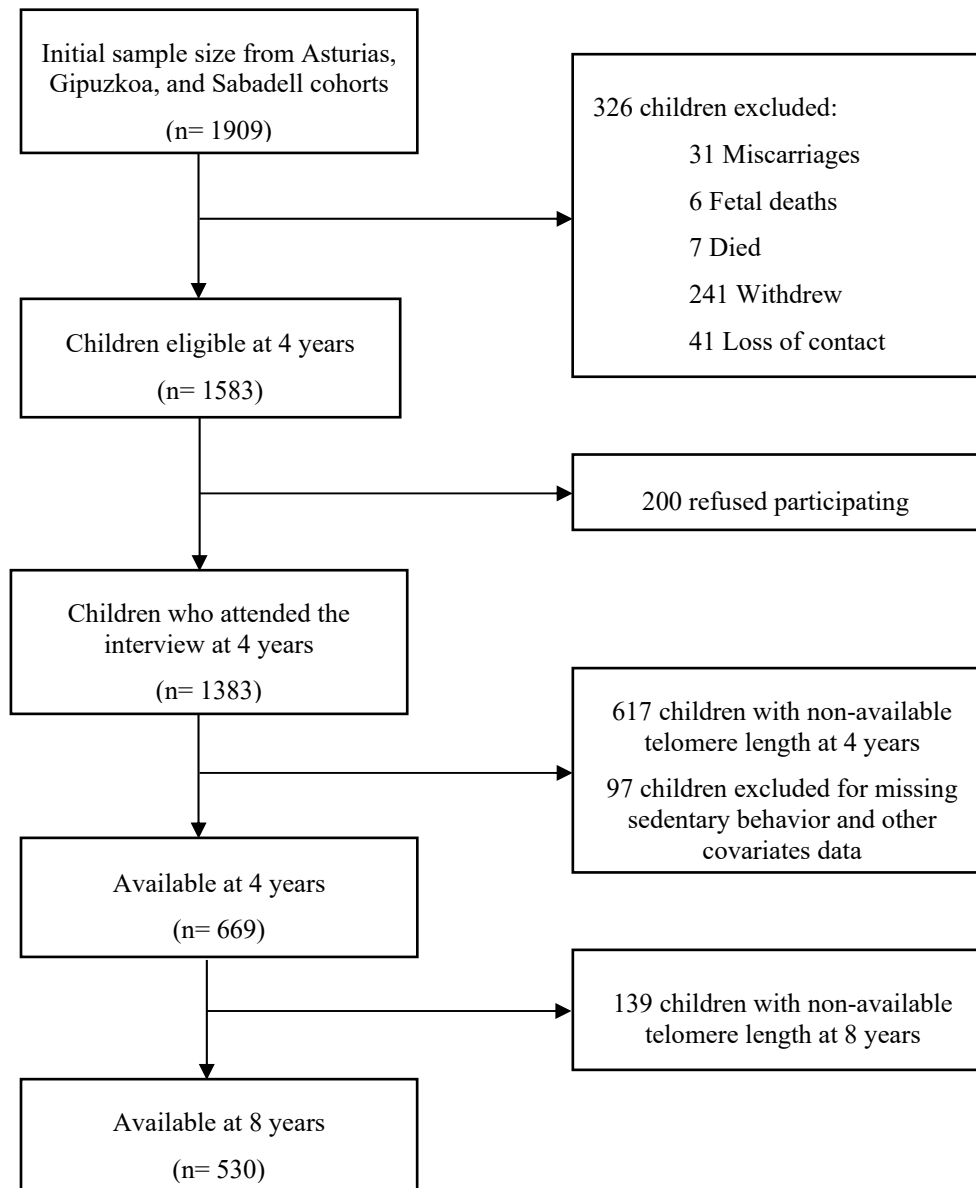
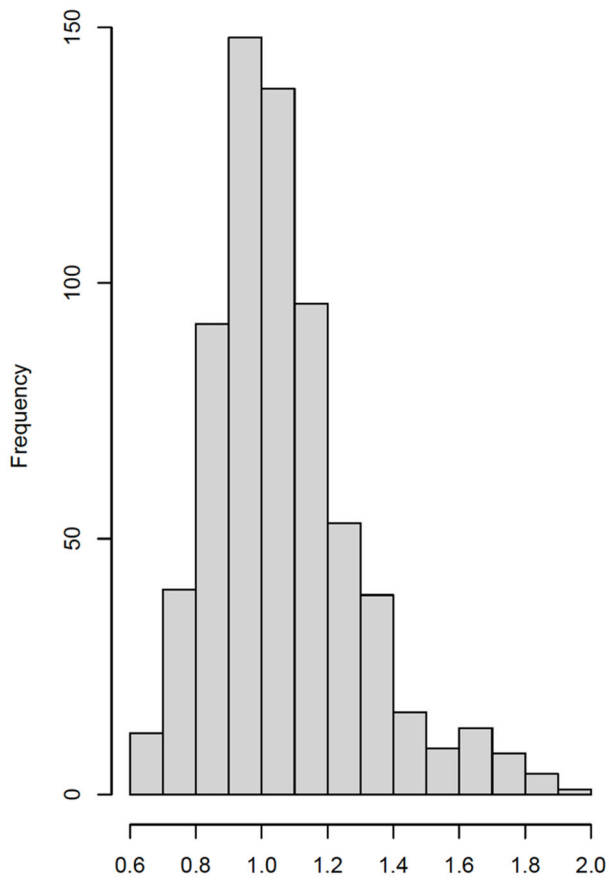
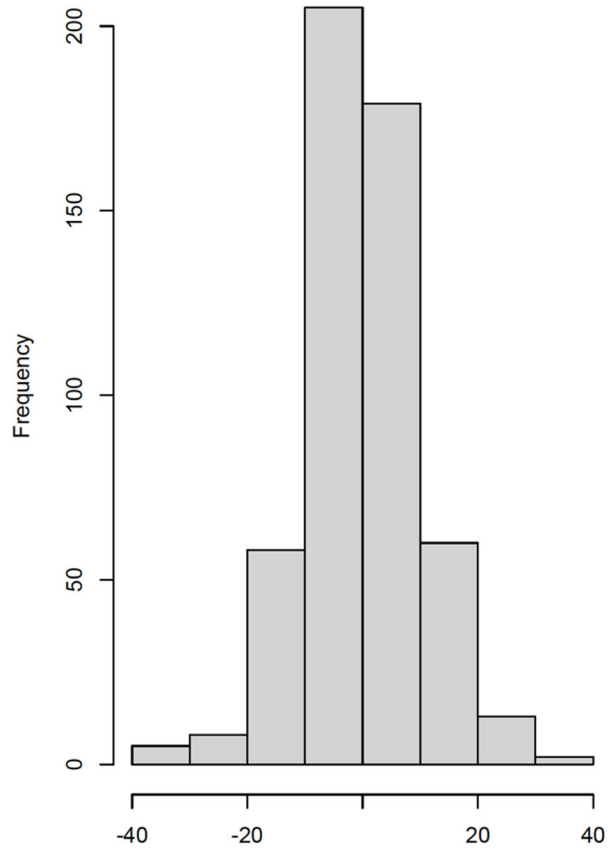


Figure S2. Distribution plot of telomere length in the study participants

A) Telomere length ratio at 4 years (n=669)



B) Telomere ranking from 4 to 8 years (n=530)



References

1. Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* (2009)37(3):e21. doi:10.1093/nar/gkn1027
2. Martens DS, Van Der Stukken C, Derom C, Thiery E, Bijmens EM, Nawrot TS. Newborn telomere length predicts later life telomere length: Tracking telomere length from birth to child- and adulthood. *EBioMedicine.* (2021)63:103164. doi:10.1016/j.ebiom.2020.103164
3. Martens DS, Janssen BG, Bijmens EM et al. Association of Parental Socioeconomic Status and Newborn Telomere Length. *JAMA Netw Open.* (2020)3(5):e204057. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.4057

Anexo 2 - Artículo científico correspondiente a la publicación II



Article

Validation of a Parent-Reported Physical Activity Questionnaire by Accelerometry in European Children Aged from 6 to 12 Years Old

Daniel Prieto-Botella, Desirée Valera-Gran, Loreto Santa-Marina, Izaro Babarro, Mikel Subiza-Pérez, Maribel Casas, Mónica Guxens, Gabriela Cárdenas-Fuentes, Barbara Heude, Jonathan Y. Bernard et al.

Special Issue

Instruments for Measuring Health

Edited by

Dr. Desirée Valera-Gran and Dr. Eva Maria Navarrete-Munoz





Article

Validation of a Parent-Reported Physical Activity Questionnaire by Accelerometry in European Children Aged from 6 to 12 Years Old

Daniel Prieto-Botella ¹, Desirée Valera-Gran ^{1,2,*}, Loreto Santa-Marina ^{3,4,5}, Izaro Babarro ^{4,6}, Mikel Subiza-Pérez ^{3,4,6}, Maribel Casas ^{3,7,8}, Mónica Guxens ^{3,7,8,9}, Gabriela Cárdenas-Fuentes ^{7,8}, Barbara Heude ¹⁰, Jonathan Y. Bernard ¹⁰, Rosemary R. C. McEachan ¹¹, Judith García-Aymerich ^{3,7,8}, Martine Vrijheid ^{3,7} and Eva-María Navarrete-Muñoz ^{1,2,12}

- ¹ Department of Surgery and Pathology, Miguel Hernandez University, 03550 Alicante, Spain; dprieto@umh.es (D.P.-B.); enavarrete@umh.es (E.-M.N.-M.)
 - ² Grupo de Investigación en Terapia Ocupacional (InTeO), Miguel Hernández University, 03550 Alicante, Spain
 - ³ Spanish Consortium for Research on Epidemiology and Public Health (CIBERESP), 28029 Madrid, Spain; ambien4ss-san@euskadi.eus (L.S.-M.); mikel.subiza@ehu.eus (M.S.-P.); maribel.casas@isglobal.org (M.C.); monica.guxens@isglobal.org (M.G.); judith.garcia@isglobal.org (J.G.-A.); martine.vrijheid@isglobal.org (M.V.)
 - ⁴ Group of Environmental Epidemiology and Child Development, Biodonostia Health Research Institute, 20014 San Sebastian, Spain; izaro.babarro@ehu.eus
 - ⁵ Ministry of Health of the Basque Government, SubDirectorate for Public Health and Addictions of Gipuzkoa, 20010 San Sebastián, Spain
 - ⁶ Department of Clinical and Health Psychology and Research Methods, University of the Basque Country UPV/EHU, 20018 San Sebastián, Spain
 - ⁷ ISGlobal, 08036 Barcelona, Spain; gabriela.cardenas@isglobal.org
 - ⁸ Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra (UPF), 08002 Barcelona, Spain
 - ⁹ Department of Child and Adolescent Psychiatry/Psychology, Erasmus University Medical Centre-Sophia Children's Hospital, 3015 Rotterdam, The Netherlands
 - ¹⁰ Centre for Research in Epidemiology and Statistics (CRESS), Université Paris Cité, Inserm, INRAE, F-75004 Paris, France; barbara.heude@inserm.fr (B.H.); jonathan.bernard@inserm.fr (J.Y.B.)
 - ¹¹ Bradford Institute for Health Research, Bradford BD9 6RJ, UK; rosie.mceachan@bthft.nhs.uk
 - ¹² Alicante Institute for Health and Biomedical Research, ISABIAL-UMH, 03010 Alicante, Spain
- * Correspondence: dvalera@umh.es; Tel.: +34-965-233-705



Citation: Prieto-Botella, D.; Valera-Gran, D.; Santa-Marina, L.; Babarro, I.; Subiza-Pérez, M.; Casas, M.; Guxens, M.; Cárdenas-Fuentes, G.; Heude, B.; Bernard, J.Y.; et al. Validation of a Parent-Reported Physical Activity Questionnaire by Accelerometry in European Children Aged from 6 to 12 Years Old. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 9178. <https://doi.org/10.3390/ijerph19159178>

Academic Editor: Paul B. Tchounwou

Received: 30 June 2022

Accepted: 26 July 2022

Published: 27 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Validated physical activity (PA) questionnaires are crucial for collecting information in large epidemiological studies during childhood. Thus, this study analyzed the validity of a parent-reported PA questionnaire based on the Children's Leisure Activities Study Survey by accelerometry in European children aged from 6 to 12 years old. We used data from 230 children of the Human Early-Life Exposome and Infancia y Medio Ambiente projects. Mean differences between moderate-to-vigorous PA (MVPA) reported by the questionnaire and the accelerometer were calculated (min/day), and its associated factors were explored by multiple robust linear regression. The agreement between methods was examined using a Bland–Altman plot. The concurrent validity of assessing MVPA was analyzed by cohort-adjusted Spearman's partial correlations. ROC curve analysis was also used to explore the questionnaire's capability to identify active children based on the World Health Organization guidelines. A moderate correlation was found between parent-reported and accelerometer MVPA ($\rho = 0.41$, $p < 0.001$). The child's sex (girl) was statistically associated with the mean MVPA difference between methods. However, this questionnaire accurately identified physically active children (area under the curve = 83.8% and 82.7% for boys and girls, cut-points = 68.6 and 45.4 min/day in MVPA, respectively). Consequently, this questionnaire is suitable for classifying active children in order to monitor public health interventions regarding PA.

Keywords: moderate-to-vigorous physical activity; validity measures; measurement; childhood

1. Introduction

Recently, the benefits of physical activity (PA) on school-aged children's physical and mental health have been well-documented [1–4]. Specifically, PA has been associated with an improvement in cardiometabolic health, musculoskeletal fitness, bone development, and cognitive outcomes, helping to reduce adiposity and enhancing children's psychological well-being [1–5]. However, these positive findings seem to depend on the dose and intensity of daily PA [5,6]. For these reasons, it is crucial to use reliable and valid instruments to monitor PA in childhood.

In large epidemiological studies, self-reported or parent-reported questionnaires have been suggested as good options to assess PA in children, mainly because they are low-cost and easy-to-administer instruments for collecting a vast amount of information [7]. However, one of the main disadvantages of self-reported questionnaires is that they are based on memory recall, thereby involving potential information biases [8–10]. Therefore, to control the variability of these subjective methods, it is essential to validate these questionnaires by comparing them with objective methods with different measurement errors (e.g., accelerometers or pedometers). A validation study can provide information on the structure and magnitude of the measurement error, and it can help in adjusting subsequent analysis and choosing a suitable statistical approach [11].

According to a recently updated systematic review of childhood PA assessment tools, there are a large number of validated questionnaires for measuring PA in children and adolescents [12]. This systematic review reported that 29 out of the 89 evaluated questionnaires were validated in children aged between 6 and 12 years old [12]. Nine of these PA questionnaires, such as the Physical Activity Questionnaire for Older Children (PAQ-C) and the Patient Assessment and Council for Exercise (PACE) [13,14], were validated in European children. However, only the PAQ-C and the ENERGY questionnaires were validated across several European countries [15]. These two PA questionnaires were created to assess general PA levels in children, but they did not provide specific daily frequency, time, or intensity estimates. The benefits of PA are related to the daily dose and intensity [5,6]; therefore, validating PA questionnaires including these parameters for the use in school-aged children remains an issue for large epidemiological studies.

Thus, this study aimed to explore the validity of a parent-reported PA questionnaire based on the Children's Leisure Activities Study Survey (CLASS) [16] by accelerometry in European children aged 6 to 12 years old.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

This study included 230 children with complete information on PA measured by questionnaire and accelerometer from different European population-based birth cohorts, the Human Early Life Exposome (HELIX, <http://www.projecthelix.eu/index.php/en>), and Infancia y Medio Ambiente (INMA, www.proyectoinma.org) projects. Detailed information on study populations and epidemiological designs of both projects has been published elsewhere [17,18]. The HELIX study is a collaborative project including the HELIX Child Panel; a study developed between 2013 and 2016 with children aged from 6 to 11 years [19]. In the present study, we used data available on child's PA from three population-based birth cohorts included in the HELIX Child Panel: BiB (Born in Bradford, United Kingdom, $n = 27$), EDEN (Étude des Déterminants pré et postnatals du développement et de la santé de l'Enfant, France, $n = 30$), and INMA-Sabadell (Spain, $n = 37$). The children's mean (standard deviation, sd) age in these cohorts was 6.7 (0.2), 10.9 (0.4), and 8.6 (0.6) years, respectively. Regarding the INMA project, we used complete data on PA of 136 children aged between 10 and 12 years old (mean = 10.7, sd = 0.2) from the follow-up performed between 2017 and 2020 in the INMA-Gipuzkoa cohort. All participants provided signed informed consent, and the respective ethical committees granted ethical approval for each study.

2.2. Questionnaire

PA was assessed by a parent-reported questionnaire based on the CLASS [16]. This questionnaire included PA assessments during school time and outside of school. Each of these parts contains a list of different activities (e.g., running, tennis, or basketball) plus the possibility to add an unspecified activity. Parents were asked: “During a typical week, does your child do any further programmed physical activities during school time?” and “Thinking about the rest of the year: does your child do any further physical activities (including planned activity or just normal play) each day outside of school hours?” followed by a question about the daily frequency and duration in minutes of the selected activity. A metabolic equivalent of task (MET) value was assigned to every activity based on previous publications on childhood and youth [20,21]. Mean minutes per day in moderate-to-vigorous PA (MVPA, ≥ 3 METs) were calculated as the sum of the minutes per day in MVPA divided by seven.

2.3. Accelerometer

PA was assessed using an ActiGraph wGT3X-BT tri-axial accelerometer (Pensacola, FL, USA) in the Helix Child Panel study, and an Activinsights GeneActiv tri-axial accelerometer (Kimbolton, UK) in the INMA-Gipuzkoa, which were worn during the same week the questionnaire was administered. Data reduction regarding both accelerometers was conducted with similar methods.

ActiGraph records raw acceleration data at a rate between 30 and 100 Hz with a memory capacity of up to 4 GB. In addition, it is characterized by being light (19 g) and small ($4.6 \times 3.3 \times 1.5$ cm). The accelerometer was worn on the right side of the hip for one week, only during the day. Raw accelerometer data were collected at 30 Hz. After data collection, ActiGraph data were downloaded and converted into 10 s epochs for post-processing using ActiLife software. The METs of each epoch were calculated using the vertical axis method, in accordance with Crouter et al. [22]. A cut-point of ≥ 3 METs was established for MVPA [22]. Non-wear time was defined as 20 min or more of consecutive zero counts, and waking hours were set between 6:00 and 23:59 [23,24]. In addition, a minimum of 10 h/day and at least three days/week of accelerometer data were needed for inclusion in the analysis [25]. Mean MVPA minutes per day were calculated for each child as follows: sum of the accelerometer minutes/number of valid days [26].

Similarly, the GeneActiv accelerometer is characterized as being light (16 g) and small ($3.6 \times 3.0 \times 1.2$ cm). It records raw acceleration data at a rate of up to 100 Hz. The accelerometer was worn on the non-dominant wrist for seven days in a 24 h regime, and data were collected at 85.7 Hz. After data collection, raw data were downloaded without time spans in CSV files using GENEActiv software. Raw data post-processing was conducted with the GGIR R package version 2.4 (<https://github.com/wadpac/GGIR>, accessed on 14 April 2022), which has been designed for processing raw accelerometer data [27]. Daily PA intensities were generated daily using the milli g cut-points published by Hildebrand et al.: sedentary–light = 56.3 mg; light–moderate = 191.6 mg; and moderate–vigorous = 695.8 mg [28,29]. These cut-points were developed to be equivalent to MET intensities. Non-wear time was identified as 15 min blocks based on the characteristics of the 60 min window, as described in previous publications [30]. Finally, waking hours, valid data, and summary variables were established based on the same criteria used for ActiGraph.

2.4. Study Covariates

Covariates included child sociodemographic and anthropometric data: cohort, age (years), sex, body mass index (BMI, kg/m^2), and BMI groups (overweight/obese, normal weight) based on the age- and sex-specific World Health Organization (WHO) cut-points [31]. In addition, the mother’s age at delivery (years) and family’s socioeconomic status (low, middle, and high) were also collected.

2.5. Statistical Analysis

R software version 4.1.2 (R Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <http://www.R-project.org>) was used to perform the statistical analysis. All statistical tests were bilateral, with an applied significance level of 0.05. The Kolmogorov–Smirnov test with Lilliefors correction was used to check the normality of continuous variables.

First, descriptive analyses of the mother–child pairs’ sociodemographic and anthropometric characteristics were conducted using frequencies and percentages. Bivariate chi-squared tests were performed to evaluate differences between cohorts. Second, the mean differences between parent-reported and accelerometer MVPA (min/day) measures were calculated and presented in a Bland–Altman plot [32]. The possible covariates associated with this difference were explored by performing a multiple robust linear regression through the “robustbase” R package [33]. Third, the concurrent validity between parent-reported and accelerometer MVPA measures was evaluated by a cohort-adjusted partial Spearman’s correlation (“ppcor” R package) [34]. Several sensitivity analyses were conducted to examine the main findings’ robustness by separately adjusting the main correlation model by the child (sex, age, and BMI) and mother (age and socioeconomic status) characteristics. Mother’s age was categorized into <31 years and ≥ 31 years based on the median value. Before performing the validity analysis, heterogeneity among the study cohorts was evaluated. The cohort-separated correlations were analyzed using meta-analytic techniques, and the heterogeneity was quantified using I^2 statistics with the “metacor” R package [35,36]. The obtained I^2 value was <25%.

Finally, we explored the capability of the questionnaire to classify children as “physically active” based on the WHO guidelines (at least 60 min/day of MVPA) [5] through the analysis of the receiver operating characteristic (ROC) curve, stratifying by children’s sex (“pROC” R package) [37]. In addition, we calculated the sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value using the optimal questionnaire threshold identified by ROC curve analysis.

3. Results

3.1. Characteristics of the Study Population

Table 1 describes the general characteristics of the mother–child pairs by cohort. On average, 52.2% of the children were girls, ranging from 37.8% to 58.2% through cohorts. In addition, BMI groups were similarly distributed among cohorts ($p = 0.17$), with an overweight/obese total percentage of 33.5%. Regarding the maternal age at delivery, 128 (55.7%) mothers were aged ≥ 31 years. The youngest mothers were found in BiB and EDEN (66.7%, respectively). The majority of the families’ socioeconomic situation was low/middle (60.0%). However, an over-representation of families with a high socioeconomic status was observed in EDEN (80.0%).

Table 1. Characteristics of mother-child pairs according to cohort.

Child’s Characteristics, n (%)	Total (n = 230)	Children Aged 6–11			Children Aged 10–12	p^a
		BiB (n = 27)	INMA-Sabadell (n = 37)	EDEN (n = 30)	INMA-Gipuzkoa (n = 136)	
Sex						0.064
Boys	110 (47.8)	13 (48.1)	23 (62.2)	18 (60.0)	56 (41.2)	
Girls	120 (52.2)	14 (51.9)	14 (37.8)	12 (40.0)	80 (58.2)	
BMI groups ^b						0.174
Overweight/obese	77 (33.5)	8 (29.6)	14 (37.8)	5 (16.6)	50 (36.8)	
Normal weight	153 (66.5)	19 (70.4)	23 (62.2)	25 (83.4)	86 (63.2)	
Mother’s characteristics, n (%)						
Age groups ^c						<0.001
<31 years	102 (44.3)	18 (66.7)	12 (32.4)	20 (66.7)	52 (38.2)	
≥ 31 years	128 (55.7)	9 (33.3)	25 (67.6)	10 (33.3)	84 (61.8)	
Socioeconomic status						<0.001
High	92 (40.0)	9 (33.3)	14 (37.8)	24 (80.0)	45 (33.1)	
Low/Middle	138 (60.0)	18 (66.7)	23 (62.2)	6 (20.0)	91 (66.9)	

^a Chi-squared tests across cohorts. ^b C Age- and sex-specific World Health Organization cut-points. ^c Cut-point based on the median value.

3.2. Mean MVPA Levels

As measured with the accelerometer, children spent an average (standard deviation) of 72.8 (43.2) min/day in MVPA. In comparison, the minutes/day in MVPA collected through questionnaire were slightly higher, being 79.2 (58.0) (Table 2). The child's sex was associated with the difference recorded between the two methods (β girls vs. boys = 15.2, 95%CI = 2.3 to 28.1, $p = 0.020$). On average, parents whose children were girls over-reported 11.9 min/day of MVPA. No other associations were observed (Table 2).

Table 2. Linear regression of the difference between questionnaire and accelerometer MVPA time adjusted for child's and mother's characteristics.

	n	MVPA (Min/Day)				
		Questionnaire	Accelerometer	Questionnaire–Accelerometer		
		Mean (SD)	Mean (SD)	Difference	β^a (95%CI)	p
Total Cohort	230	79.2 (58.0)	72.8 (43.2)	6.4	-	-
BiB	27	52.3 (43.2)	42.1 (19.5)	10.2	Ref	0.781
INMA-Sabadell	37	43.4 (27.0)	49.8 (24.3)	-6.4	-8.9 (-31.2 to 13.5)	
EDEN	30	26.0 (22.9)	31.1 (21.8)	-5.1	-8.7 (-28.1 to 10.8)	
INMA-Gipuzkoa	136	106.0 (56.4)	94.4 (40.5)	11.6	-4.0 (-25.4 to 17.3)	
Child's characteristics						
Sex						0.020
Boys	110	84.8 (65.0)	84.5 (48.9)	0.3	Ref	
Girls	120	74.1 (50.4)	62.2 (34.1)	11.9	15.2 (2.3 to 28.1)	
Age groups ^b						0.817
≤10.6 years	114	61.3 (46.2)	58.2 (33.2)	2.8	Ref	
>10.6 years	116	96.8 (63.0)	87.2 (47.0)	9.6	1.9 (-14.4 to 18.2)	
BMI ^c						0.299
Overweight/obese	77	79.4 (58.8)	69.0 (43.7)	10.4	Ref	
Normal	153	79.1 (57.8)	74.7 (42.9)	4.4	-6.8 (-19.6 to 6.1)	
Mother's characteristics						
Age groups ^b						0.451
<31 years	102	73.5 (55.5)	68.4 (44.6)	5.1	Ref	
≥31 years	128	83.8 (59.7)	76.4 (41.8)	7.4	-4.6 (-16.5 to 7.4)	
Socioeconomic status						0.856
High	92	66.7 (51.4)	64.5 (44.4)	2.2	Ref	
Low/Middle	138	87.6 (60.8)	78.4 (41.6)	9.2	1.1 (-11.1 to 13.3)	

Abbreviations: MVPA, moderate-to-vigorous physical activity; SD, standard deviation; CI, confidence interval. ^a Robust linear regression β coefficients adjusted for cohort and all child's and mother's characteristics. ^b Cut-point based on the median value. ^c Age- and sex-specific World Health Organization cut-points.

3.3. Concurrent Validity

Spearman's partial correlation adjusted for cohort between parent-reported and accelerometer MVPA time was 0.41 (95%CI = 0.30 to 0.51, $p < 0.001$). This correlation remained almost of the same strength after adjusting for other relevant variables such as the child's age ($\rho = 0.41$, 95%CI = 0.30 to 0.51, $p < 0.001$) or BMI ($\rho = 0.40$, 95%CI = 0.29 to 0.51, $p < 0.001$). A slight decrease was only observed when adjusting for the child's sex ($\rho = 0.38$, 95%CI = 0.26 to 0.48, $p < 0.001$).

3.4. Agreement between Methods

The Bland–Altman plot (Figure 1) showed a mean bias between methods (parent-reported vs. accelerometer) of 6.4 min/day of MVPA (95% limits of agreement = -91.9 to 104.7). A total of nine cases (3.9%) were outside the limits of agreement. Children with a mean MVPA (i.e., parent-reported + accelerometer) > 100 min/day tended to present higher differences between methods.

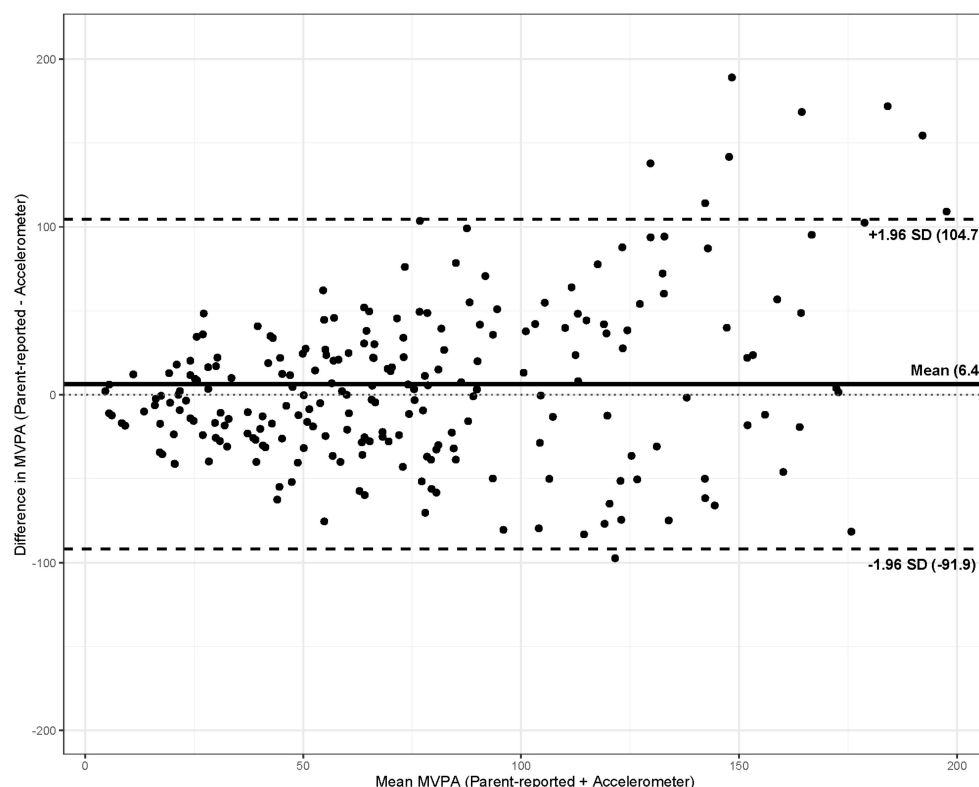


Figure 1. Bland–Altman plot with mean bias (solid line) and 95% limits of agreement (dashed lines) between the children’s parent-reported and accelerometer measurements of moderate-to-vigorous physical activity (MVPA, min/day).

3.5. Known-Groups Validity

There were 51.7% of girls and 60.0% of boys classified as physically active (≥ 60 min/day of MVPA) based on the accelerometer. The ROC curve analysis showed an area under the curve (AUC) of 83.8% (95%CI = 76.6 to 91.0%) and 82.7% (95%CI = 75.2 to 90.3%) for girls and boys, respectively (Table 3). In addition, this analysis established an optimal threshold of 68.6 min/day of MVPA for classifying active boys based on the parent-reported questionnaire (sensitivity = 72.7%, specificity = 79.5%). However, this optimal threshold was lower in girls (45.4 min/day of MVPA, sensitivity = 96.8, specificity = 60.3).

Table 3. Validity to identify children who accumulated ≥ 60 versus <60 min/day of MVPA based on the accelerometry using the parent-reported questionnaire optimal thresholds.

	Girls (n = 120)	Boys (n = 110)
Parent-reported MVPA threshold (min/day) ^a	45.4	68.6
Sensitivity (95%CI)	96.8% (88.8 to 99.6)	72.7% (60.4 to 83.0)
Specificity (95%CI)	60.3% (46.6 to 73.0)	79.5% (64.7 to 90.2)
Positive predictive value (95%CI)	72.3% (61.4 to 81.6)	84.2% (72.1 to 92.5)
Negative predictive value (95%CI)	94.6% (81.8 to 99.3)	66.0% (51.7 to 78.5)
Area under the curve (95%CI) ^a	83.8% (76.6 to 91.0)	82.7% (75.2 to 90.3)
Physically active prevalence ^b	51.7% (42.4 to 60.9)	60.0% (50.2 to 69.2)

Abbreviations: MVPA, moderate-to-vigorous physical activity; CI, confidence interval. ^a Based on the receiver operating characteristic (ROC) analysis. ^b ≥ 60 min/day versus <60 min/day of MVPA based on accelerometry.

4. Discussion

The results suggested a moderate correlation between parent-reported and accelerometer MVPA. Although the Bland–Altman plot showed an acceptable agreement across methods, the error and overestimation tended to rise as mean MVPA increased. Specifically,

children with a mean MVPA (i.e., parent-reported + accelerometer) > 100 min/day showed greater differences between methods. Interestingly, this difference was associated with the child's sex, with parents of girls being more prone to overestimate their daughter's MVPA. The optimal questionnaire MVPA threshold identified by the ROC curve analysis was lower in girls in comparison with boys. However, this assessment tool showed an adequate accuracy in identifying physically active children.

The correlation between parent-reported and accelerometry MVPA found in this study was moderate ($\rho = 0.41$), but in line with the current literature. A recent review published by Hidding and colleagues found that barely 7 out of 29 child-oriented (≥ 6 to <12 years) PA questionnaires had correlation values above 0.50 [12]. A possible explanation for these moderate correlations could be that children may not accurately recall the amount of time spent in PA due to cognitive immaturity and variable activity patterns, which are more challenging to remember [38,39]. However, in our case, parent reporting can, to some extent, vary from direct measurements because parents might have difficulty adequately quantifying the PA of their children, taking into account the activities performed in their spare time and those at the school [38]. Furthermore, it should be noted that PA measured by the questionnaire may differ from that measured by an accelerometer. The questionnaire asks about PA during a "typical week," whereas the accelerometers recorded data from a specific week, suggesting that PA could be different.

Our findings also showed that parents tended to slightly overestimate (6.4 min/day on average) the levels of MVPA of their children. The literature on validation studies indicates that self-reported methods tend to over-report PA. According to the review conducted by Adamo and colleagues, 72% of the reviewed child-oriented indirect methods, including questionnaires, overestimated the PA values measured by direct methods, showing differences between methods ranging from -95% to $13,025\%$ [40]. Similar results can be observed in the review by Hidding and colleagues, where MVPA mean differences ranged from -15.6 to 117.6 min [12]. Nevertheless, our results were among the estimates with the lowest differences between a PA questionnaire vs. accelerometry found by Hidding or Adamo [12,40]. The potential recall and information biases previously identified could explain this difference [38,39]. In the present study, the difference between methods was associated with the child's sex, because girls' parents tended to overestimate their daughter's activity. A possible explanation could rely on the observed lower PA level of girls compared with boys, which has been evidenced in previous studies [41,42]. It has been theorized that parents may compare their child with other children of the same age and sex when judging and compiling their child's PA level [43]. Therefore, girls' parents could be more prone to overestimate their daughter's PA due to their frame of reference [43]. Consistent with other studies, this result highlights the importance of taking sex into account in PA research during the early stages of life [43–45].

The Bland–Altman plot analysis showed a good agreement between methods, suggesting that the analyzed questionnaire provided reasonable estimates of daily MVPA. However, a slight positive magnitude bias was observed, in line with other published validation studies [12]. Children with a mean MVPA (i.e., parent-reported + accelerometer) > 100 min/day presented greater differences between methods. The Chinese version of the CLASS also observed this bias in a similar group of participants [46]. The authors suggested that this bias could be attributable to the intermittent nature of PA, because children usually do not engage in sustained PA, but perform it in several bouts. Thus, parents can report that their children play one hour of basketball as MVPA, even though some of the time was possibly less strenuous [46]. Furthermore, the accelerometer protocols establish the removal of the device for contact and water-based sports, leading to a possible under-recording of these activities.

Our questionnaire also showed a good discriminant power for classifying physically active boys and girls based on the WHO guidelines ($AUC > 0.8$) [5]. Furthermore, the girls' optimal questionnaire threshold identified by the ROC curve analysis suggested that the questionnaire classified girls as physically active with less MVPA time (45.4 min/day) than

the accelerometer (≥ 60 min/day) in comparison with boys (68.6 min/day). In light of our findings, this could be explained by the lower MVPA of girls vs. boys, which is in line with previous studies in children [41,42]. Although the underlying reasons still need to be clarified, it has been theorized that, due to the girls' lower PA level, parents may expect their daughters' playing style to be quieter and to spend less time engaging in sports [47].

In this study, several limitations should be considered before interpretation of the findings. First, the analyzed sample may not be representative of the total population because it was part of a subsample of HELIX and INMA projects. However, this study had a multi-centric European design that could provide valuable insights into the involved cohorts. Second, our sample could be over-represented by the Gipuzkoa participants, who were also evaluated with a different accelerometer compared with the other cohorts. However, we observed a similar MVPA correlation value after excluding the children from Gipuzkoa (data not shown), performing accelerometer data reduction using shared criteria to address this limitation. Finally, we considered the child's sex in our analysis to account for possible measurement differences, and the validity of the results was first explored using meta-analytic techniques to identify a possible heterogeneity between cohorts.

5. Conclusions

The validity of assessing MVPA level between the parent-reported questionnaire and the accelerometer was moderate. This questionnaire could be suitable for identifying physically active children, although the estimates for PA duration should be treated with caution. In addition, we would like to emphasize the importance of considering the child's sex when evaluating or using PA data. Nevertheless, because accelerometry devices are costly, increase participant burden, and do not provide information on activity type, the use of this questionnaire can be appropriate for monitoring public health interventions regarding PA.

Author Contributions: Conceptualization, D.V.-G., M.C., J.G.-A. and E.-M.N.-M.; methodology, D.V.-G., M.C., J.G.-A. and E.-M.N.-M.; formal analysis, D.V.-G. and E.-M.N.-M.; data curation, D.P.-B.; writing—original draft preparation, D.P.-B. and D.V.-G.; writing—review and editing, D.P.-B., D.V.-G., L.S.-M., I.B., M.S.-P., M.C., M.G., G.C.-F., B.H., J.Y.B., R.R.C.M., J.G.-A., M.V. and E.-M.N.-M.; supervision, D.V.-G. and E.-M.N.-M.; funding acquisition, D.V.-G., L.S.-M., M.C., M.G., R.R.C.M., M.V. and E.-M.N.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by funding from the European Community's Seventh Framework Programme [FP7/2007–2013] under grant agreement no. 308333—the HELIX project. INMA data collections were supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (Red INMA G03/176; CB06/02/0041; PI041436; PI081151 incl. FEDER funds; PI12/01890 incl. FEDER funds; CP13/00054 incl. FEDER funds; PI15/00118 incl. FEDER funds; CP16/00128 incl. FEDER funds; PI16/00118 incl. FEDER funds; PI16/00261 incl. FEDER funds; PI17/01340 incl. FEDER funds; PI18/00547 incl. FEDER funds, PI18/01237 incl. FEDER funds, PI18/00825 incl. FEDER funds); Generalitat Valenciana (GVA/2021/191); CIBERESP; and the Generalitat de Catalunya-CIRIT 1999SGR 00241; Generalitat de Catalunya-AGAUR (2009 SGR 501, 2014 SGR 822), Fundació La marató de TV3 (090430). ISGlobal acknowledges support from the Spanish Ministry of Science and Innovation through the "Centro de Excelencia Severo Ochoa 2019–2023" Program (CEX2018-000806-S), and support from the Generalitat de Catalunya through the CERCA Program, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2012-32991 incl. FEDER funds), Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation de l'Environnement et du Travail (1262C0010; EST-2016 RF-21), EU Commission (261357, 308333, 603794 and 634453); and annual agreements with the municipalities of the study area (Zumarraga, Urretxu, Legazpi, Azkoitia y Azpeitia y Beasain). M.C. and M.G. hold Miguel Servet fellowships (CP16/00128, CPII18/00018) funded by Instituto de Salud Carlos III and co-funded by European Social Fund "Investing in your future". R.R.C.M. received funding from the National Institute for Health Research Applied Research Collaboration for Yorkshire and Humber.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and all cohorts received approval from the ethics committees of the centers involved.

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Janssen, I.; Leblanc, A.G. Systematic Review of the Health Benefits of Physical Activity and Fitness in School-Aged Children and Youth. *Int. J. Behav. Nutr. Phys. Act.* **2010**, *7*, 40. [CrossRef] [PubMed]
2. Skrede, T.; Steene-Johannessen, J.; Anderssen, S.A.; Resaland, G.K.; Ekelund, U. The Prospective Association between Objectively Measured Sedentary Time, Moderate-to-Vigorous Physical Activity and Cardiometabolic Risk Factors in Youth: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Obes. Rev.* **2019**, *20*, 55–74. [CrossRef] [PubMed]
3. Poitras, V.J.; Gray, C.E.; Borghese, M.M.; Carson, V.; Chaput, J.-P.; Janssen, I.; Katzmarzyk, P.T.; Pate, R.R.; Connor Gorber, S.; Kho, M.E.; et al. Systematic Review of the Relationships between Objectively Measured Physical Activity and Health Indicators in School-Aged Children and Youth. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2016**, *41*, S197–S239. [CrossRef] [PubMed]
4. Rodríguez-Ayllon, M.; Cadenas-Sánchez, C.; Estévez-López, F.; Muñoz, N.E.; Mora-Gonzalez, J.; Migueles, J.H.; Molina-García, P.; Henriksson, H.; Mena-Molina, A.; Martínez-Vizcaíno, V.; et al. Role of Physical Activity and Sedentary Behavior in the Mental Health of Preschoolers, Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med.* **2019**, *49*, 1383–1410. [CrossRef] [PubMed]
5. WHO Guidelines on Physical Activity and Sedentary Behaviour. Available online: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240015128> (accessed on 2 September 2021).
6. World Health Organization. *Global Action Plan on Physical Activity 2018–2030: More Active People for a Healthier World*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2018; ISBN 978-92-4-151418-7.
7. Mindell, J.S.; Coombs, N.; Stamatakis, E. Measuring Physical Activity in Children and Adolescents for Dietary Surveys: Practicalities, Problems and Pitfalls. *Proc. Nutr. Soc.* **2014**, *73*, 218–225. [CrossRef]
8. Haskell, W.L. Physical Activity by Self-Report: A Brief History and Future Issues. *J. Phys. Act. Health* **2012**, *9*, S5–S10. [CrossRef]
9. Chinapaw, M.J.M.; Mokkink, L.B.; van Poppel, M.N.M.; van Mechelen, W.; Terwee, C.B. Physical Activity Questionnaires for Youth: A Systematic Review of Measurement Properties. *Sports Med.* **2010**, *40*, 539–563. [CrossRef]
10. Helmerhorst, H.H.J.; Brage, S.; Warren, J.; Besson, H.; Ekelund, U. A Systematic Review of Reliability and Objective Criterion-Related Validity of Physical Activity Questionnaires. *Int. J. Behav. Nutr. Phys. Act.* **2012**, *9*, 103. [CrossRef]
11. Althubaiti, A. Information Bias in Health Research: Definition, Pitfalls, and Adjustment Methods. *JMDH* **2016**, *9*, 211–217. [CrossRef]
12. Hidding, L.M.; Chinapaw, M.J.M.; van Poppel, M.N.M.; Mokkink, L.B.; Altenburg, T.M. An Updated Systematic Review of Childhood Physical Activity Questionnaires. *Sports Med.* **2018**, *48*, 2797–2842. [CrossRef]
13. Benítez-Porres, J.; López-Fernández, I.; Raya, J.F.; Álvarez Carnero, S.; Alvero-Cruz, J.R.; Álvarez Carnero, E. Reliability and Validity of the PAQ-C Questionnaire to Assess Physical Activity in Children. *J. Sch. Health* **2016**, *86*, 677–685. [CrossRef]
14. Van Hoya, A.; Nicaise, V.; Sarrazin, P. Self-Reported and Objective Physical Activity Measurement by Active Youth. *Sci. Sports* **2014**, *29*, 78–87. [CrossRef]
15. Singh, A.S.; Vik, F.N.; Chinapaw, M.J.M.; Uijtdewilligen, L.; Verloigne, M.; Fernández-Alvira, J.M.; Stomfai, S.; Manios, Y.; Martens, M.; Brug, J. Test-Retest Reliability and Construct Validity of the ENERGY-Child Questionnaire on Energy Balance-Related Behaviours and Their Potential Determinants: The ENERGY-Project. *Int. J. Behav. Nutr. Phys. Act.* **2011**, *8*, 136. [CrossRef] [PubMed]
16. Telford, A.; Salmon, J.; Jolley, D.; Crawford, D. Reliability and Validity of Physical Activity Questionnaires for Children: The Children’s Leisure Activities Study Survey (CLASS). *Pediatric Exerc. Sci.* **2004**, *16*, 64–78. [CrossRef]
17. Maitre, L.; de Bont, J.; Casas, M.; Robinson, O.; Aasvang, G.M.; Agier, L.; Andrušaitytė, S.; Ballester, F.; Basagaña, X.; Borràs, E.; et al. Human Early Life Exposome (HELIX) Study: A European Population-Based Exposome Cohort. *BMJ Open* **2018**, *8*, e021311. [CrossRef] [PubMed]
18. Guxens, M.; Ballester, F.; Espada, M.; Fernández, M.F.; Grimalt, J.O.; Ibarluzea, J.; Olea, N.; Rebagliato, M.; Tardón, A.; Torrent, M.; et al. Cohort Profile: The INMA—Infancia y Medio Ambiente—(Environment and Childhood) Project. *Int. J. Epidemiol.* **2012**, *41*, 930–940. [CrossRef]
19. Donaire-Gonzalez, D.; Curto, A.; Valentín, A.; Andrusaityte, S.; Basagaña, X.; Casas, M.; Chatzi, L.; de Bont, J.; de Castro, M.; Dedele, A.; et al. Personal Assessment of the External Exposome during Pregnancy and Childhood in Europe. *Environ. Res.* **2019**, *174*, 95–104. [CrossRef]
20. Ridley, K.; Ainsworth, B.E.; Olds, T.S. Development of a Compendium of Energy Expenditures for Youth. *Int. J. Behav. Nutr. Phys. Act.* **2008**, *5*, 45. [CrossRef]
21. Butte, N.F.; Watson, K.B.; Ridley, K.; Zakeri, I.F.; McMurray, R.G.; Pfeiffer, K.A.; Crouter, S.E.; Herrmann, S.D.; Bassett, D.R.; Long, A.; et al. A Youth Compendium of Physical Activities: Activity Codes and Metabolic Intensities. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2018**, *50*, 246–256. [CrossRef]

22. Crouter, S.E.; Horton, M.; Bassett, D.R. Use of a 2-Regression Model for Estimating Energy Expenditure in Children. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2012**, *44*, 1177–1185. [[CrossRef](#)]
23. Rowlands, A.V.; Dawkins, N.P.; Maylor, B.; Edwardson, C.L.; Fairclough, S.J.; Davies, M.J.; Harrington, D.M.; Khunti, K.; Yates, T. Enhancing the Value of Accelerometer-Assessed Physical Activity: Meaningful Visual Comparisons of Data-Driven Translational Accelerometer Metrics. *Sports Med. Open* **2019**, *5*, 47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Aadland, E.; Andersen, L.B.; Anderssen, S.A.; Resaland, G.K. A Comparison of 10 Accelerometer Non-Wear Time Criteria and Logbooks in Children. *BMC Public Health* **2018**, *18*, 323. [[CrossRef](#)]
25. Scott, J.J.; Rowlands, A.V.; Cliff, D.P.; Morgan, P.J.; Plotnikoff, R.C.; Lubans, D.R. Comparability and Feasibility of Wrist- and Hip-Worn Accelerometers in Free-Living Adolescents. *J. Sci. Med. Sport* **2017**, *20*, 1101–1106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Steene-Johannessen, J.; Hansen, B.H.; Dalene, K.E.; Kolle, E.; Northstone, K.; Møller, N.C.; Grøntved, A.; Wedderkopp, N.; Kriemler, S.; Page, A.S.; et al. Variations in Accelerometry Measured Physical Activity and Sedentary Time across Europe—Harmonized Analyses of 47,497 Children and Adolescents. *Int. J. Behav. Nutr. Phys. Act.* **2020**, *17*, 38. [[CrossRef](#)]
27. Migueles, J.H.; Rowlands, A.V.; Huber, F.; Sabia, S.; van Hees, V.T. GGIR: A Research Community-Driven Open Source R Package for Generating Physical Activity and Sleep Outcomes From Multi-Day Raw Accelerometer Data. *J. Meas. Phys. Behav.* **2019**, *2*, 188–196. [[CrossRef](#)]
28. Hildebrand, M.; VAN Hees, V.T.; Hansen, B.H.; Ekelund, U. Age Group Comparability of Raw Accelerometer Output from Wrist- and Hip-Worn Monitors. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2014**, *46*, 1816–1824. [[CrossRef](#)]
29. Hildebrand, M.; Hansen, B.H.; van Hees, V.T.; Ekelund, U. Evaluation of Raw Acceleration Sedentary Thresholds in Children and Adults. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **2017**, *27*, 1814–1823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Fairclough, S.J.; Noonan, R.; Rowlands, A.V.; Van Hees, V.; Knowles, Z.; Boddy, L.M. Wear Compliance and Activity in Children Wearing Wrist- and Hip-Mounted Accelerometers. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2016**, *48*, 245–253. [[CrossRef](#)]
31. WHO. Child Growth Standards: Length/Height-for-Age, Weight-for-Age, Weight-for-Length, Weight-for-Height and Body Mass Index-for-Age: Methods and Development. Available online: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/924154693X> (accessed on 8 February 2022).
32. Bland, J.M.; Altman, D.G. Measuring Agreement in Method Comparison Studies. *Stat. Methods Med. Res.* **1999**, *8*, 135–160. [[CrossRef](#)]
33. Maechler, M.; Rousseeuw, P.; Croux, C.; Todorov, V.; Ruckstuhl, A.; Salibian-Barrera, M.; Verbeke, T.; Koller, M.; Conceicao, E.; di Palma, M. Robustbase: Basic Robust Statistics; R Package Version 0.93-8. 2021. Available online: <http://robustbase.r-forge.r-project.org/> (accessed on 28 January 2022).
34. Kim, S. Ppcor: An R Package for a Fast Calculation to Semi-Partial Correlation Coefficients. *Commun. Stat. Appl. Methods* **2015**, *22*, 665–674. [[CrossRef](#)]
35. Laliberté, E. Metacorr: Meta-Analysis of Correlation Coefficients. 2019. Available online: <https://cran.r-project.org/web/packages/metacorr/metacorr.pdf> (accessed on 28 January 2022).
36. Mickey, R.M.; Greenland, S. The Impact of Confounder Selection Criteria on Effect Estimation. *Am. J. Epidemiol.* **1989**, *129*, 125–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Robin, X.; Turck, N.; Hainard, A.; Tiberti, N.; Lisacek, F.; Sanchez, J.-C.; Müller, M. PROC: An Open-Source Package for R and S+ to Analyze and Compare ROC Curves. *BMC Bioinform.* **2011**, *12*, 77. [[CrossRef](#)]
38. Corder, K.; Ekelund, U.; Steele, R.M.; Wareham, N.J.; Brage, S. Assessment of Physical Activity in Youth. *J. Appl. Physiol.* **2008**, *105*, 977–987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Sallis, J.F.; Saelens, B.E. Assessment of Physical Activity by Self-Report: Status, Limitations, and Future Directions. *Res. Q. Exerc. Sport* **2000**, *71*, 1–14. [[CrossRef](#)]
40. Adamo, K.B.; Prince, S.A.; Tricco, A.C.; Connor-Gorber, S.; Tremblay, M. A Comparison of Indirect versus Direct Measures for Assessing Physical Activity in the Pediatric Population: A Systematic Review. *Int. J. Pediatr. Obes.* **2009**, *4*, 2–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Guthold, R.; Stevens, G.A.; Riley, L.M.; Bull, F.C. Global Trends in Insufficient Physical Activity among Adolescents: A Pooled Analysis of 298 Population-Based Surveys with 1.6 Million Participants. *Lancet Child Adolesc. Health* **2020**, *4*, 23–35. [[CrossRef](#)]
42. Cherney, I.D.; London, K. Gender-Linked Differences in the Toys, Television Shows, Computer Games, and Outdoor Activities of 5- to 13-Year-Old Children. *Sex Roles* **2006**, *54*, 717. [[CrossRef](#)]
43. Corder, K.; van Sluijs, E.M.F.; McMinn, A.M.; Ekelund, U.; Cassidy, A.; Griffin, S.J. Perception Versus Reality: Awareness of Physical Activity Levels of British Children. *Am. J. Prev. Med.* **2010**, *38*, 1–8. [[CrossRef](#)]
44. Corder, K.; Crespo, N.C.; van Sluijs, E.M.F.; Lopez, N.V.; Elder, J.P. Parent Awareness of Young Children’s Physical Activity. *Prev. Med.* **2012**, *55*, 201–205. [[CrossRef](#)]
45. Crespo, N.C.; Corder, K.; Marshall, S.; Norman, G.J.; Patrick, K.; Sallis, J.F.; Elder, J.P. An Examination of Multilevel Factors That May Explain Gender Differences in Children’s Physical Activity. *J. Phys. Act. Health* **2013**, *10*, 982–992. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Huang, Y.J.; Wong, S.H.S.; Salmon, J. Reliability and Validity of the Modified Chinese Version of the Children’s Leisure Activities Study Survey (CLASS) Questionnaire in Assessing Physical Activity among Hong Kong Children. *Pediatr. Exerc. Sci.* **2009**, *21*, 339–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Dinella, L.M.; Weisgram, E.S. Gender-Typing of Children’s Toys: Causes, Consequences, and Correlates. *Sex Roles* **2018**, *79*, 253–259. [[CrossRef](#)]

Anexo 3 - Código de Investigación Responsable (COIR)



INFORME DE EVALUACIÓN DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE

Elche, a 10/03/2023

Director/a	Eva María Navarrete Muñoz
Codirectores/as	Desirée Valera Gran
Estudiante	Daniel Prieto botella
Programa de doctorado	Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas
Título de la tesis doctoral	Influencia de la actividad física y las conductas sedentarias en la longitud del telómero en la infancia: Proyecto TeloDiPA
Tipo de actividad	Adherido a un proyecto autorizado
Evaluación Riesgos Laborales	No procede
Evaluación Ética	No procede
Código provisional	230307180536
Código de Investigación Responsable (COIR)	ADH.SPU.ENM.DPB.23
Caducidad	8 años*

***Importante:** La caducidad de las autorizaciones de tesis, basadas en la adhesión a un proyecto de investigación, están condicionadas a la vigencia de la autorización de dicho proyecto en este sentido: todas las actividades de la tesis que tengan implicaciones ético-legales deberán realizarse mientras dicho proyecto esté vigente. Dicho de otro modo, sólo podrán realizarse actividades de carácter intelectual una vez el proyecto al que se adhiere haya caducado.

Se considera que la presente actividad no supone riesgos laborales adicionales a los ya evaluados en el proyecto de investigación al que se adhiere. No obstante, es responsabilidad del tutor/a informar y/o formar al estudiante de los posibles riesgos laborales de la presente actividad.

La necesidad de evaluación ética del trabajo titulado: **Influencia de la actividad física y las conductas sedentarias en la longitud del telómero en la infancia: Proyecto TeloDiPA** ha sido realizada en base a la información aportada en el formulario online: "Solicitud Código de Investigación Responsable (COIR)", habiéndose determinado que no requiere ninguna evaluación adicional. Es importante destacar que si la información aportada en dicho formulario no es correcta este informe no tiene validez.

Por todo lo anterior, **se autoriza** la realización de la presente actividad.

Atentamente,

Alberto Pastor Campos
Secretario del CEII
Vicerrectorado de Investigación

Domingo L. Orozco Beltrán
Presidente del CEII
Vicerrectorado de Investigación

AGRADECIMIENTOS

Es difícil para mí asumir que escribir estos agradecimientos supone concluir una de las etapas más significativas de mi vida, una etapa cargada de trabajo, emociones y, sobre todo, de personas. Por ello, me gustaría dedicar un momento para expresar mi más sincero agradecimiento a aquellos/as que han hecho posible este trabajo.

En primer lugar, agradecer a mis directoras de tesis, Eva M^a Navarrete y Desirée Valera. Gracias por darme la oportunidad y depositar vuestra confianza en mí para esta tarea. Agradeceros, a su vez, todo el apoyo que me habéis brindado durante estos años. Vuestra guía, experiencia, conocimientos y esfuerzo han sido el pilar de mi crecimiento como investigador y como persona. Gracias Eva por creer en mí y motivarme a llevar a cabo empresas que jamás hubiera creído poder realizar. Gracias Desi por tu paciencia, consejos, seguridad y los momentos de abstracción filosófica que hemos compartido. Verdaderamente, gracias a ambas.

Por otra parte, me gustaría agradecer a un grupo de personas muy especial que me han brindado su apoyo durante este periodo, personas que han sido (y son) mis compañeras, mi equipo, Paula Fernández, Irene Campos y Rocío Muñoz. Paula, a veces las palabras sobran, pero en este caso no me bastan. Gracias por las llamadas interminables a horas intempestivas, gracias por estar a mi lado en los peores y mejores días, gracias por los abrazos reparadores y gracias por toda la ayuda sincera que me has ofrecido. Irene, gracias por los viajes en coche, gracias por las conferencias donde siempre he sentido tu apoyo, gracias por los inolvidables momentos en el plató de la universidad y gracias por haber estado ahí cuando más lo he necesitado. Rocío, gracias por tu empatía, gracias por acordarte de mí en esos momentos importantes y gracias por tu sincero ofrecimiento de ayuda ante cualquier imprevisto. A todas juntas, gracias por los cafés, por las llamadas multinivel en momentos de crisis, por vuestro apoyo y, en definitiva, gracias, amigas mías.

Agradezco también al resto de mis compañeros/as Paula Peral, Alicia Sánchez, Miriam Hurtado, Verónica Company, Iris Juárez, Cristina Espinosa, Gema Moreno y José Ángel Pastor. Agradeceros enormemente vuestro apoyo, ánimo y consejos, gracias por haber estado ahí. Gracias por haberme introducido al mundo de la docencia y por todos los hechos que hacen que escriba vuestros nombres con una sonrisa.

Me gustaría también agradecer a todas las familias que han participado en el estudio Infancia y Medio Ambiente y que han hecho posible este trabajo. Además, mil gracias a todos los investigadores/as de INMA y HELIX que me han ayudado estos años.

I want to express my heartfelt gratitude to Dries Martens and Tim Nawrot for their hospitality, kindness, and for providing me with a unique experience during my research stay in Belgium. I am confident that the lessons learned, and the memories shared during this time will accompany me throughout my career. In addition, thank you Dries for the various opportunities you provided me to explore and experience the culture and life in Belgium. Your guidance and recommendations made my stay even more special and memorable. I truly felt embraced in a new and unfamiliar environment. Dankjewel.

A mis padres, nunca habrá palabras de agradecimiento suficientes como para plasmar vuestra entrega, apoyo y paciencia infinitos. Sin vosotros nunca habría podido conseguir este éxito en mi vida. Gracias por creer en mí incondicionalmente. Gracias también a mi hermana Sofía, quien ha tenido la paciencia para aguantarme estos años. Sé que te sientes orgullosa de tu hermano, y he decirte que yo de ti, también.

Agradecer también al resto de mi maravillosa familia. Gracias por cada momento compartido juntos, vuestro ánimo y por vuestro apoyo siempre constante.

Gracias de corazón a Paquita, abuelita, abu, por el amor y cariño incondicional, por dejarte arrastrar a mis clases como sujeto de pruebas, y por esos abrazos que me das desde que tengo memoria.

Grazie alla mia famiglia italiana, a Marco, a Patrizia, ai nonni Gino e Noemi e ad Aldo. Grazie per avermi accompagnato in questo percorso con i vostri consigli, il vostro appoggio ed il vostro affetto. Avete avuto un ruolo fondamentale nel raggiungimento di questo importante traguardo. Vi voglio bene.

Por último, este trabajo no hubiera sido posible sin ti, Elena. Cuando ni yo mismo creía en mí, ahí estabas tú para recordarme que tenía la capacidad de superar cualquier obstáculo. Cuando estaba desanimado, ahí estabas tú para alentarme y mejorar mi visión del mundo. Cuando la carga parecía abrumadora e imposible, ahí estabas tú para aportar tus soluciones, ideas y perspectivas que han enriquecido mi trabajo durante estos años. Gracias por haber estado a mi lado en cada paso de este camino, y que suerte el pensar en los que nos quedan por recorrer.