



# Impacto de la Reprogramación Celular Parcial Somática en la Expresión de Elementos Transponibles en Piel

**Estudiante: Javier Lázaro Requejo**

MÁSTER EN BIOINFORMÁTICA Y CIENCIA DE DATOS  
EN MEDICINA PERSONALIZADA DE PRECISIÓN Y SALUD

2023-2024



*UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA*

DIRECTOR y CO-DIRETORES DE LA TESIS: *DIANA GUALLAR ARTAL*.

COLABORADORES: *ALEJANDRO FUENTES IGLESIAS, HELENA COVELO*

*MOLARES*

FECHA: *ENERO 2025*



## 0. Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a Diana Guallar por haberme elegido para realizar este TFM con su equipo, pues encontré justo lo que buscaba. Desde que decidí embarcarme en el máster, con una sólida base tecnológica y una firme curiosidad por el análisis informático aplicado a temas revolucionarios como el envejecimiento y la reprogramación celular con factores de Yamanaka.

Este proyecto no solo ha satisfecho mi anhelo de explorar estos campos, sino que también ha enriquecido mi capacidad para comprender y analizar artículos de investigación de alto nivel. Gracias a su elección doy totalmente por recompensado el año de esfuerzo personal en la parte puramente lectiva del máster, principalmente en temas relacionados con la parte menos técnica y más biológica.

Quiero agradecer de manera especial a Alejandro y a Helena, quienes me han brindado un apoyo incondicional en todo momento. Su ayuda y disposición han facilitado mi adaptación a al proyecto, haciendo del proceso algo cómodo y accesible.

Lamento no haber podido desplazarme físicamente para colaborar más estrechamente con ellos, en lo profesional y en lo personal, ya que estoy convencido de que habría aprendido aún más con su experiencia. Sin embargo, su comprensión y flexibilidad ante mis circunstancias familiares han sido invaluable para mí.

Por último, pero no menos importante, quiero expresar mi profunda gratitud a mi hija, Claudia. Su llegada ha significado un cambio radical en mis prioridades y en la manera en que dispongo mi tiempo. En gran parte, lo que antes dedicaba a satisfacer mis inquietudes y curiosidades se ha transformado en momentos de plena felicidad, compartidos junto a ella.

# **1. Índice de contenidos**

- 0. Agradecimientos
- 1. Índice de contenidos
- 2. Resumen (Abstract)
- 3. Objetivos
- 4. Introducción
- 5. Materiales y Métodos
- 6. Resultados
- 7. Discusión
- 8. Conclusiones
- 9. Bibliografía
- 10. Anexos

## 2. Resumen (Abstract)

La reprogramación parcial in vivo mediante la expresión transitoria de los factores de Yamanaka: Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (OSKM) ha mostrado un gran potencial para revertir parcialmente algunos marcadores epigenéticos del envejecimiento. En este Trabajo de Fin de Máster se replican y analizan datos de un estudio previo (Browder et al., 2022, Nature Aging) en el que se describe el efecto de la administración a largo plazo de OSKM en ratones de tipo salvaje de diferentes edades (WT).

Concretamente, y una vez confirmada la reproducibilidad de los resultados originales relativos a la expresión diferencial de genes asociados al envejecimiento, hemos centrado nuestro análisis en el papel de los Elementos transponibles (TE, por sus siglas en inglés), usando la herramienta Tetranscripts para realizar el análisis diferencial de estos elementos repetitivos bajo el mismo enfoque de reprogramación.

Se realizaron comparaciones entre ratones jóvenes (3 meses) y ratones con distintas edades (22-26 meses) tratados o no con doxiciclina (1 mes, 7 meses y 10 meses de tratamiento). Estos ratones son modelos Knock-in con OSKM inducible (Tet-on), en los cuales la adición de doxiciclina activa la expresión del casete OSKM. Se emplearon diferentes visualizaciones (Volcano plots, PCA, Heatmaps, Box Plots y MA plots) para mostrar cambios en genes y TE.

Los resultados confirman, por un lado, la validez del reanálisis con expresiones casi idénticas a las gráficas de Análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) del estudio original, y por otro lado, la modulación de la expresión de determinados TE en las condiciones de reprogramación tanto en el tratamiento de reprogramación corto (1 mes) como en el prolongado (10 meses). Este hallazgo sugiere que la reprogramación parcial podría repercutir en el control epigenético de elementos transponibles, un área que merece mayor profundización en futuros estudios.

### 3. Objetivos

#### 1. Objetivo principal:

- Reprocesar los datos de RNA-seq del estudio de Browder et al. y realizar un análisis focalizado en la expresión de *Elementos transponibles* para evaluar si la reprogramación parcial afecta su expresión a corto (1 mes) y largo plazo (7 y 10 meses).

#### 2. Objetivos específicos:

1. Reproducir el análisis de reprogramación parcial en ratones WT presentado por Browder et al. (Nature Aging, 2022), utilizando nuestros pipelines bioinformáticos personalizados.
2. Validar que nuestros datos y resultados (especialmente en PCA y análisis de expresión diferencial) coinciden con los resultados principales del estudio original, particularmente en la valoración de la eficacia de la reprogramación a 1 y 10 meses (reprogramación celular corta y larga).
3. Cuantificar y comparar específicamente la expresión de Elementos transponibles bajo distintas condiciones de edad y tratamiento, empleando la herramienta Tetranscripts.
4. Generar un conjunto de figuras (PCA, volcano plots, heatmaps, boxplot, MA Plot) para interpretar la expresión de TEs, en ratones pertenecientes a los distintos grupos de edad.
5. Discernir posibles tendencias de regulación de TE durante la reprogramación parcial.

## 4. Introducción

La búsqueda de estrategias para revertir o desacelerar el envejecimiento ha generado un interés creciente en la comunidad científica, impulsando numerosos estudios en los últimos años. Entre las aproximaciones experimentales más innovadoras, destaca la expresión intermitente de los factores de reprogramación OSKM (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc), conocidos como factores de Yamanaka [1].

Estos factores fueron inicialmente identificados por su capacidad para inducir pluripotencia en fibroblastos de ratón [1]. Se ha demostrado que la expresión transitoria de estos factores puede restaurar ciertos marcadores epigenéticos asociados a un estado joven, evitando la dediferenciación completa y la aparición de teratomas [2].

En modelos experimentales, la reprogramación parcial ha mostrado resultados prometedores, como retrasar rasgos de envejecimiento y extender la esperanza de vida en modelos de progeria [2]. Sin embargo, existían dudas de los efectos de esta técnica en el proceso de envejecimiento fisiológico en ratones de tipo salvaje.

Para abordar esta cuestión, Browder et al. (2022) diseñaron protocolos de reprogramación parcial de distintas duraciones (1, 7 y 10 meses) en ratones silvestres, mostrando que los tratamientos prolongados inducen cambios rejuvenecedores más pronunciados a nivel epigenético y transcriptómico, especialmente en tejidos como el riñón o la piel [3]. Asimismo, se observaron modificaciones en la firma metabólica que iban acompañadas de mejoras en procesos inflamatorios y de senescencia [3,4].

El Trabajo de Fin de Máster (TFM) que aquí se presenta hace uso de los datos generados en el estudio de Browder et al., pero se centra en la regulación de los elementos transponibles (TE), un aspecto que no fue analizado en la publicación original.

Se ha propuesto que la desrepresión de los TE puede contribuir a la inestabilidad genómica propia del envejecimiento [5], de ahí la relevancia de valorar su impacto en este contexto.

Para ello, se empleó la herramienta Tetranscripts, diseñada para cuantificar la expresión de TE a partir de datos de RNA-seq, y se realizaron diversos análisis de PCA, volcano plots, ML Plots y heatmaps que comparan ratones jóvenes y viejos, tratados o no con los factores de reprogramación. Además, antes de

acometer dicho análisis, se validó la robustez de los resultados reproduciendo el PCA publicado para genes convencionales.

En resumen, este enfoque no solo reproduce los hallazgos clave relacionados con la reprogramación parcial a nivel de expresión génica, sino que también aporta nuevos datos sobre cómo estos protocolos pueden modular la expresión de los elementos transponibles, contribuyendo así al entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares del envejecimiento.

# 5. Materiales y métodos

## 5.1. Descripción general del estudio y de los datos

Los datos de ARN-seq se descargaron del repositorio indicado por Browder et al. ([GSE190983](#) , [GSE190984](#) y [GSE190985](#)).

El diseño experimental (ver Fig. 1 del paper original) incluyó ratones 4F en distintos estadios de edad y distintos periodos de administración intermitente de doxiciclina:

- \* Cohorte 1: Inicio a los 25 meses, durante 1 mes (tratamiento corto).
- \* Cohorte 2: Inicio a los 15 meses, hasta los 22 meses (7 meses de tratamiento).
- \* Cohorte 3: Inicio a los 12 meses, hasta los 22 meses (10 meses de tratamiento).

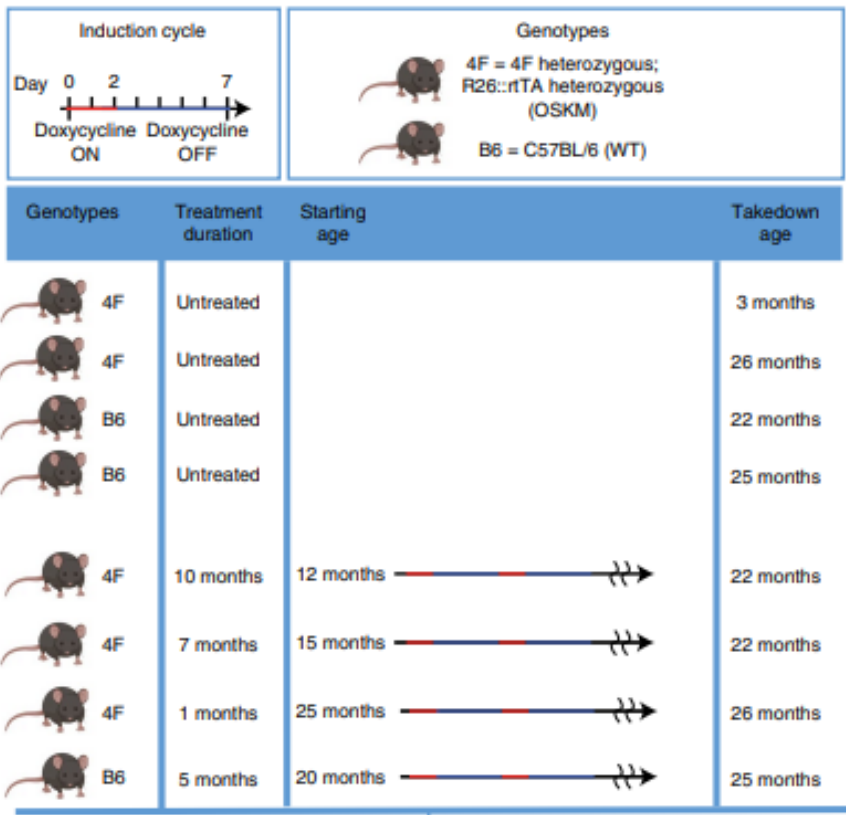


Figura A: Adaptada de Browder et al 2022, Nature



Se incluyeron también ratones control (jóvenes de 3 meses y viejos sin doxiciclina, 22-25 meses) y ratones C57BL/6 tratados con dox para descartar efectos inespecíficos del antibiótico.

A partir de estos datos, para el análisis de TEs, se seleccionaron principalmente las muestras de la cohorte de 1 y 10 meses, para estudiar tanto la reprogramación celular en un corto periodo de tiempo como prolongada.

## 5.2. Pipeline de análisis de Elementos transponibles

Para la cuantificación de TE se utilizó la herramienta TETranscripts [Fig. TE], la cual requiere:

- ☐ **Descarga de datos** (FASTQ) del SRA ([GSE190983](#) , [GSE190984](#) y [GSE190985](#)) usando herramienta SRA-Toolkit.
- ☐ **Control de calidad** para verificar la calidad de las lectura (Single-end, 50bp), así como la orientación de la librería. (FastQC, MultiQC)
- ☐ **Alineación** contra el genoma de referencia (Ensembl GRCm39, Mus musculus) y obtención de archivos BAM. (STAR)
- ☐ **Conteo de lecturas** diferenciando entre genes canónicos (Ensembl) y TEs.
- ☐ **TETranscript:**
  - Indexación de anotaciones GTF (genes) y TEs.
  - Cálculo de expresión para TEs Modo multi. Reverse stranded.
  - Generación de tablas de conteo y análisis diferencial para genes y TEs.

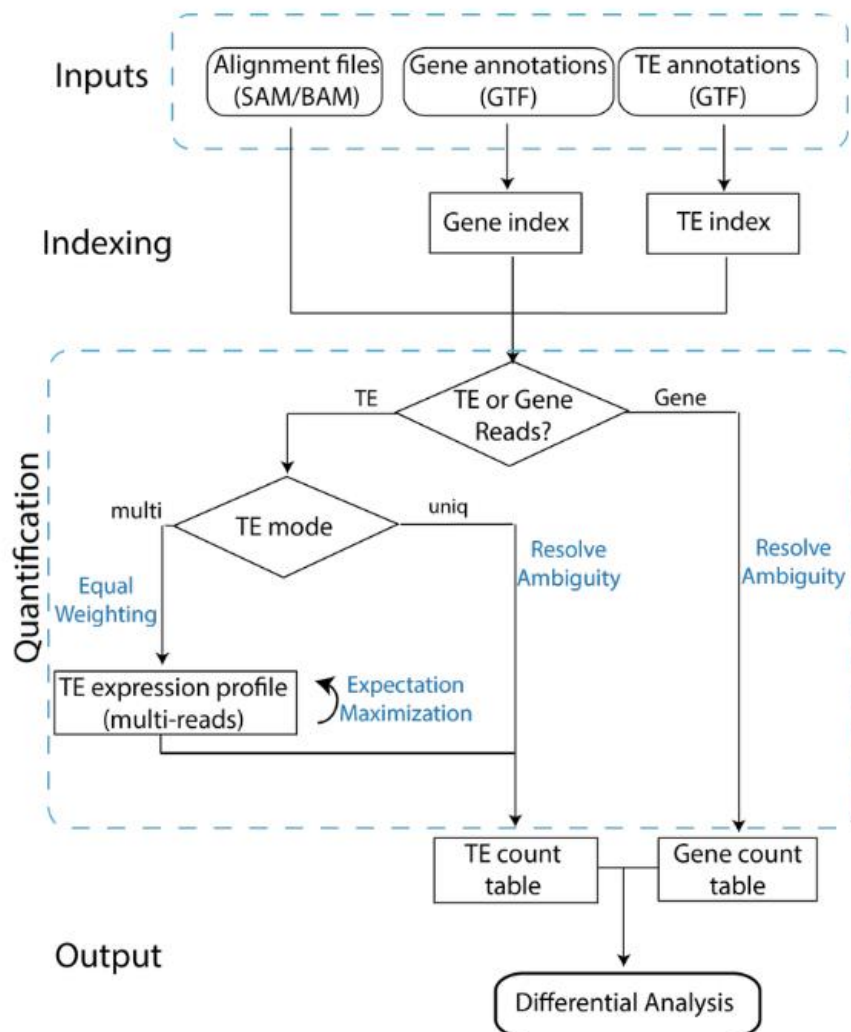


Figura TE: Workflow del pipeline de Tetranscript. [Adaptada de Jin Y, et al. (2015) ]

### 5.3. Análisis con DESeq2 y filtrado de datos

Los recuentos de TEs y genes se procesaron con R usando DESeq2 para la normalización, cálculo de  $\log_2\text{FoldChange}$  y  $p\text{-adj}$  ( $FDR$ ), de la misma forma en la que son generados con Tetranscript a partir de las tablas de contajes. Se filtraron los TEs y genes que se encontraban por debajo de un umbral de expresión (menos de 1 lectura en el máximo de las muestras), y se definieron como significativos los que tuvieran:

- $p\text{adj} < 0.05$

Para la representación de resultados se emplearon volcano plots, mapas de calor (heatmaps) con escalado por filas y clustering jerárquico de muestras.

# 6. Resultados

## 6.1 Validación de resultados originales:

Procedemos a hacer un estudio y análisis de las figuras de la publicación original y a reproducir algunas de ellas, una vez ejecutado nuestro pipeline para asegurarnos que el resultado obtenido es correcto y que podemos reproducirlo a nivel de TEs.

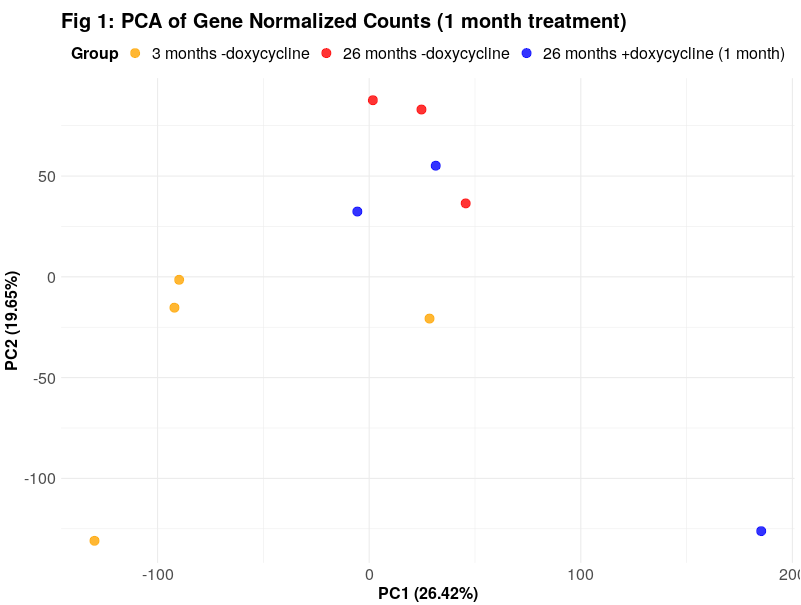


Figura 1: PCA de conteos normalizados (Análisis TFM)

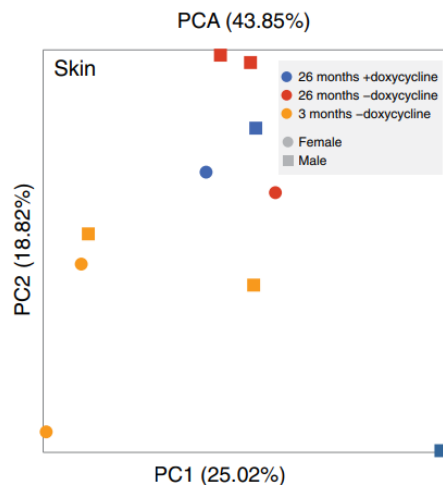


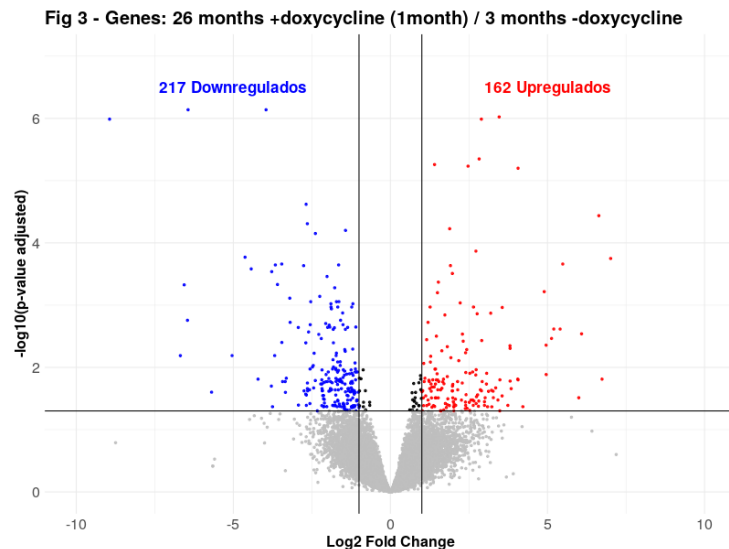
Fig 2 PCA Artículo original (Adaptada de Browder et al, 2022.Nature - fig 3c)

La Fig. 1 (izq.) se corresponde con el análisis realizado como parte del proceso de validación y reproducibilidad del estudio anterior.

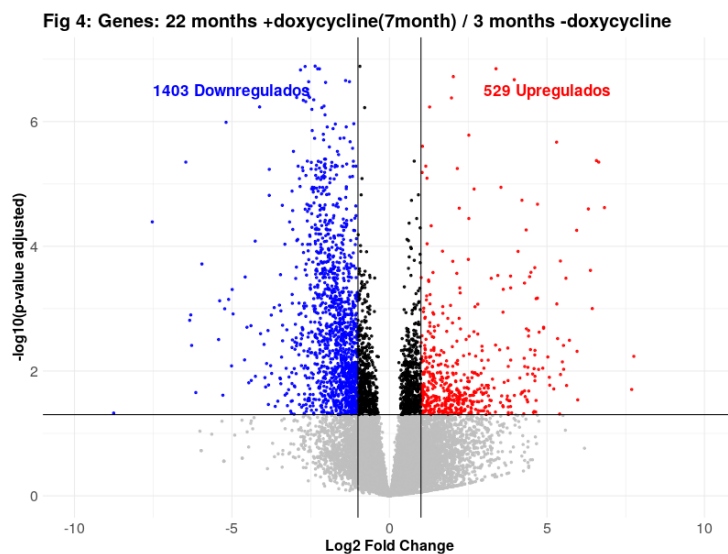
Esta figura se asemeja mucho a las reportadas en el paper original (derecha) (Browder et al., Figs. 3c), validando así la reproducibilidad de nuestro pipeline a nivel transcriptómico y la correcta asignación de muestras.

## 6.2 Análisis exploratorio y selección de tratamiento:

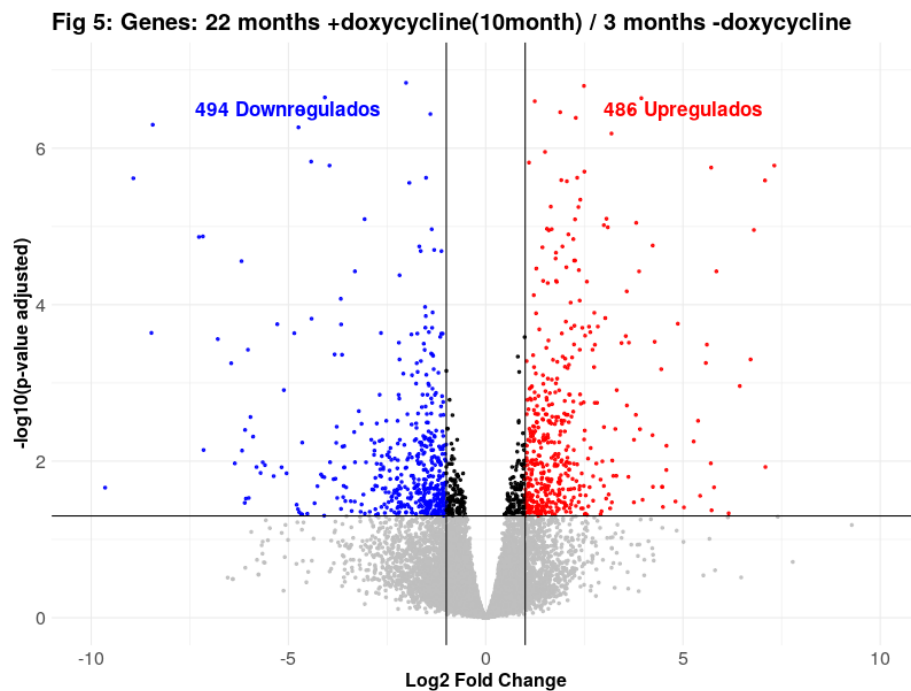
Procedemos a realizar un primer análisis exploratorio de la expresión génica mediante Volcano Plots. Primero identifiqué los genes diferencialmente expresados, con el criterio de  $FDR < 0.05$ ) entre los ratones viejos (26 meses de edad) rejuvenecidos con OSKM durante un mes (+dox) y los ratones jóvenes de 3 meses.



**Fig. 3** Tratamiento corto (1 mes): Volcano Plot Genes (26 months +doxycycline /3 months–doxycycline). Se observan 217 genes expresados “a la baja” ( $FDR < 0.05$ ;  $FC < -1$ ) y 162 “al alza” ( $FDR < 0.05$ ;  $FC > 1$ )



**Fig 4:** Volcano Plot : Tratamiento largo (7 meses).



**Fig 5:** Volcano Plot : Tratamiento largo (10 meses).

Notamos mayor número de genes diferencialmente expresados en los tratamientos de 7 y 10 meses (que empezaron con 15 y 12 meses de edad respectivamente), cuando el tratamiento de reprogramación es largo, que en 1 mes (que empezó a los 26 meses de edad).

### ¿Cómo interpretar estos resultados respecto a “revertir envejecimiento”?

En un primer vistazo, podríamos pensar que “cuanto menos cambios a nivel transcriptómico haya, más se parece el perfil de expresión al de un ratón joven (3 meses)” . Esto, tendría sentido desde el punto de vista de “revertir” a un patrón más cercano al control joven. Sin embargo, hay **dos matices** importantes:

- 1. OSKM activa numerosas vías y procesos a nivel transcriptómico.** Una expresión prolongada de estos factores genera cambios en la expresión génica que no solo están relacionados con la reversión del envejecimiento, sino también con la activación de otras vías no relacionadas. Estos efectos podrían explicar las discrepancias observadas en el número de genes diferencialmente expresados.
- 2. La edad de partida (12 o 15 vs. 25 meses) cambia el punto de referencia.** A los 25 meses, es muy posible que la fisiología de base ya sea muy distinta, de modo que se requieran menos o más cambios para acercarse al “fenotipo

joven”. Con 25 meses, además, la respuesta al tratamiento podría ser diferente que con 12 o 15 meses.

Dicho esto, **si lo único que miramos es cuántos genes cambian** respecto al control joven, podríamos proponer lo siguiente:

- **Figura 3 (ratones de 25 meses + dox de 1 mes):** Pese a tener pocos genes regulados, no es totalmente comparable a las otras dos, justamente por la edad tan avanzada. Puede que el tratamiento no induzca muchos cambios o que la comparación no sea tan limpia por la gran diferencia de edad a la que se empezó el tratamiento. En cualquier caso, la expresión génica de esa cohorte es, en esa edad avanzada, bastante parecida al del joven.
- **Figura 4 (ratones de 15 meses + dox de 7 meses):** Tiene la mayor cantidad de genes diferencialmente expresados, lo cual sugiere que este grupo difiere bastante del perfil joven, lo cual es un resultado esperado.
- **Figura 5 (ratones de 12 meses + dox de 10 meses):** Menos genes regulados que la Figura 4, sugiriendo un perfil algo “menos envejecido” que el del grupo anterior (tratamiento de 7 meses), al menos en el sentido de que no se desvía tanto de la expresión en los ratones jóvenes. Siendo este un comportamiento esperado.

Por tanto, **en términos de “parecerse” más a un ratón joven**, podríamos determinar que entre los grupos de 22 meses de edad (tratamiento largo), el de la Figura 5 (12 meses + 10 meses de dox) parece “más cercano” al perfil joven que el de la Figura 4 (15 meses + 7 meses de dox), simplemente porque regula menos genes de manera significativa.

Por tanto, **no conviene comparar directamente** la Figura 1 con las otras dos, porque involucra ratones de 26 meses (no es un set experimental del todo equivalente) y un tratamiento mucho más puntual (1 mes) que los de 7 y 10 meses. Por lo que procederemos a analizar de manera individual y comparativa, pero teniendo en cuenta los sesgos anteriormente mencionados, tanto el tratamiento corto (1 mes), como el largo (10 meses).



## 6.3 Análisis del tratamiento corto (1 mes) y largo (10 meses):

### 6.3.1 Análisis PCA de Elementos transponibles.

Para profundizar en cómo la reprogramación parcial podría afectar a la expresión de elementos transponibles, se generaron PCA a partir de los conteos normalizados de TEs.

En las siguientes figuras se muestran, los resultados correspondientes a un mes y a diez meses de tratamiento, incluyendo ratones jóvenes sin tratamiento.

Con ello, se pretende discernir si el factor ‘edad’ prevalece sobre el efecto de la reprogramación o si, por el contrario, se observan cambios notables atribuibles a la inducción con doxiciclina.

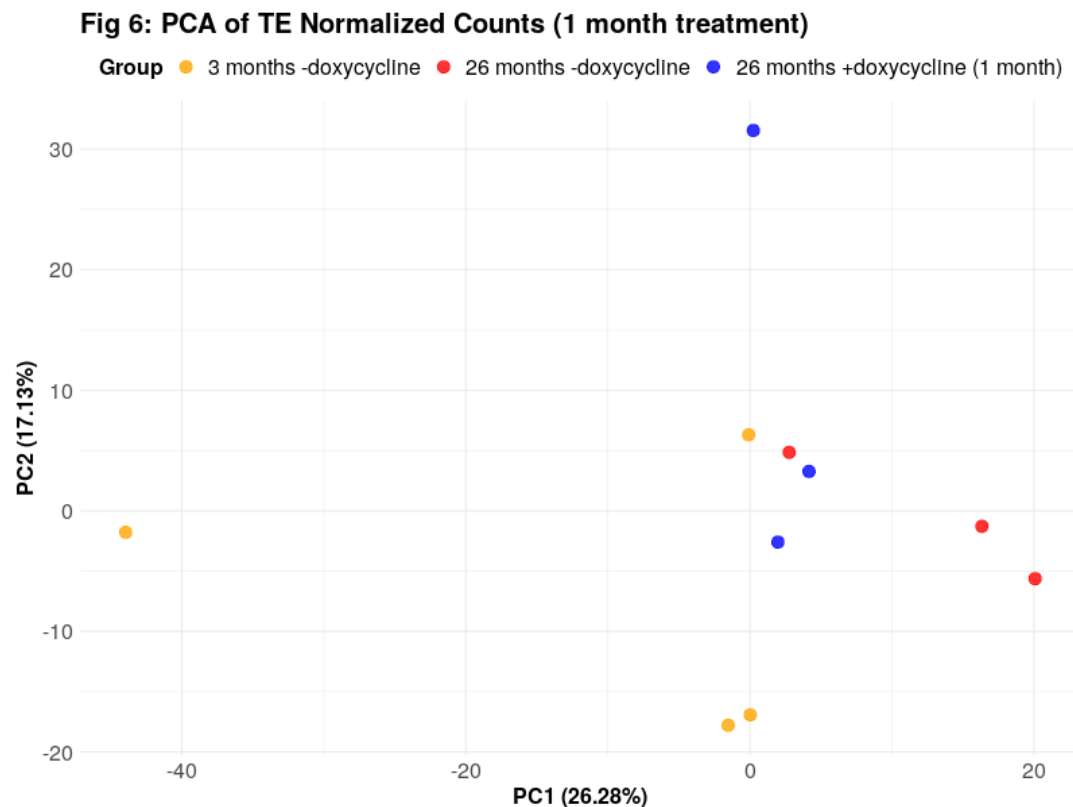
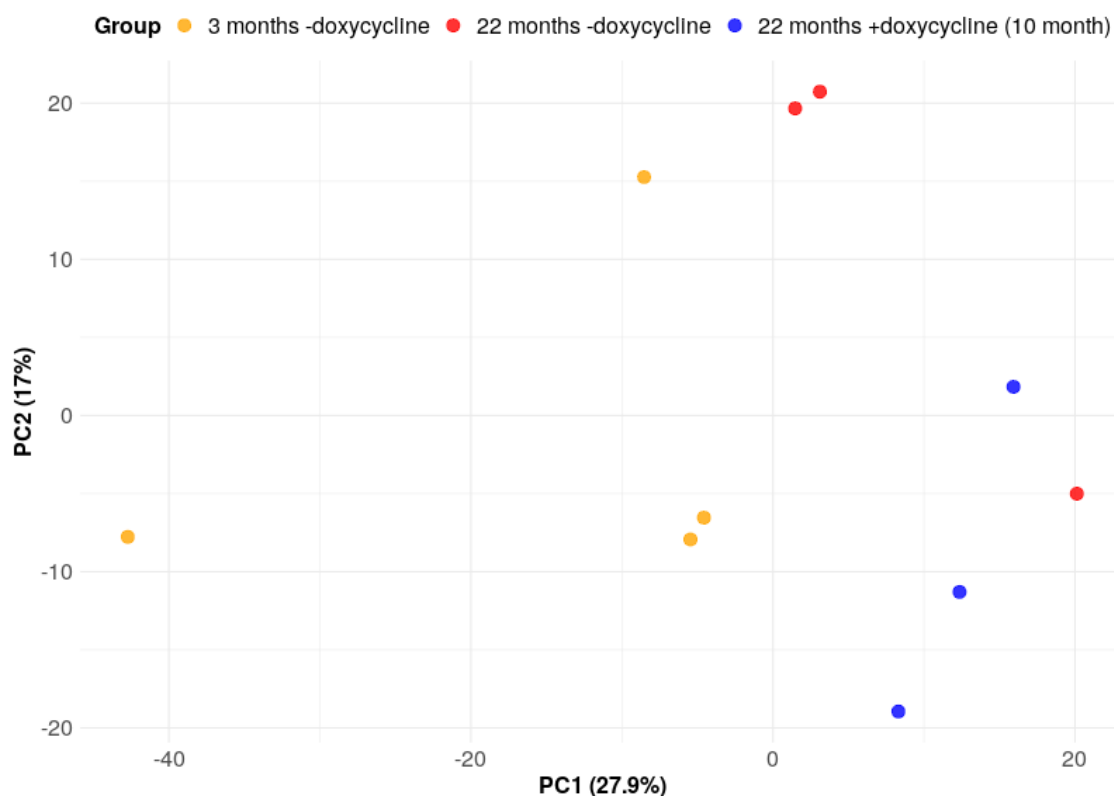


Figura 6: 26 meses con 1 mes tratamiento

**Fig 6b: PCA of TE Normalized Counts (10 month treatment)**



*Figura 6b: 22 meses con 10 meses tratamiento*

En las **Figuras 6 (26 meses con 1 mes tratamiento) y 6b (22 meses con 10 meses tratamiento)** se representa el PCA basado en los conteos normalizados de Elementos transponibles en ratones jóvenes (3m) y viejos (22–26m), con (+dox) o sin (–dox) tratamiento. El porcentaje de varianza explicado por los dos primeros componentes (PC1 ~26–28%, PC2 ~17–18%) indica que estos ejes capturan una proporción moderada de la variación global.

#### 1. **Figura 6 (1 mes)**

- A primera vista, podría parecer que los grupos ‘26m + dox’ y ‘26m – dox’ se solapan en parte. Sin embargo, si ignoramos la muestra vieja que se sitúa próxima a las jóvenes (un posible outlier biológico), se aprecia un **clúster más limpio** de los individuos tratados, diferenciándose mejor del grupo no tratado.
- De hecho, las réplicas jóvenes (3m, color amarillo) también se agrupan con relativa consistencia, por lo que, más allá de una o dos muestras “aberrantes”, se observa un **buen clustering** entre jóvenes, viejos tratados y viejos no tratados.

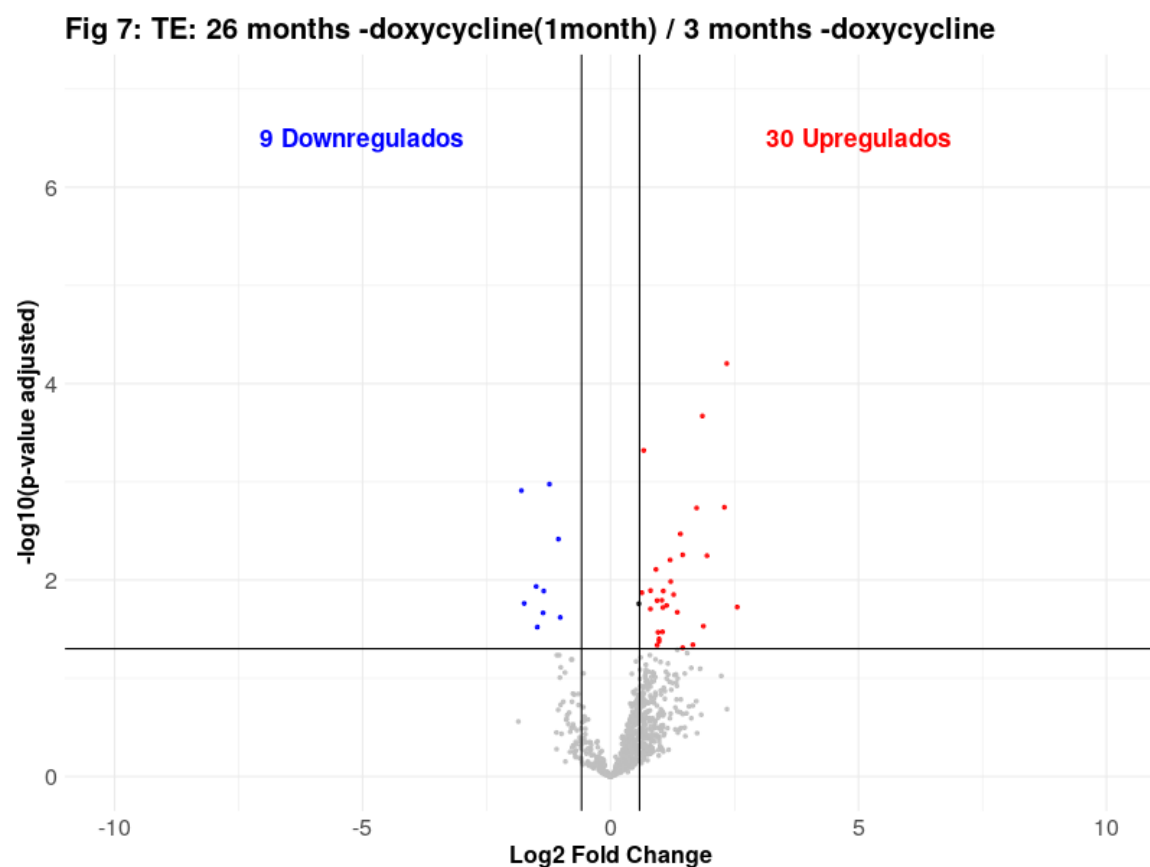
## 2.Figura 6b (10 meses)

- De nuevo, prescindiendo de una muestra joven y otra vieja algo atípicas, las réplicas **tienden a reagruparse** según el estado de tratamiento. Esto sugiere un cambio notable en el perfil de TE en los ratones sometidos a reprogramación prolongada frente a los no tratados.

Al descartar las réplicas potencialmente aberrantes se aprecia un **clustering consistente** que indica diferencias relevantes entre grupos tratados y no tratados. Por tanto, los datos sí respaldan que ambos protocolos de reprogramación (1 mes y 10 meses) generan un **gran cambio a nivel transcriptómico** en los TE, a pesar de la variabilidad biológica habitual en estudios in vivo.

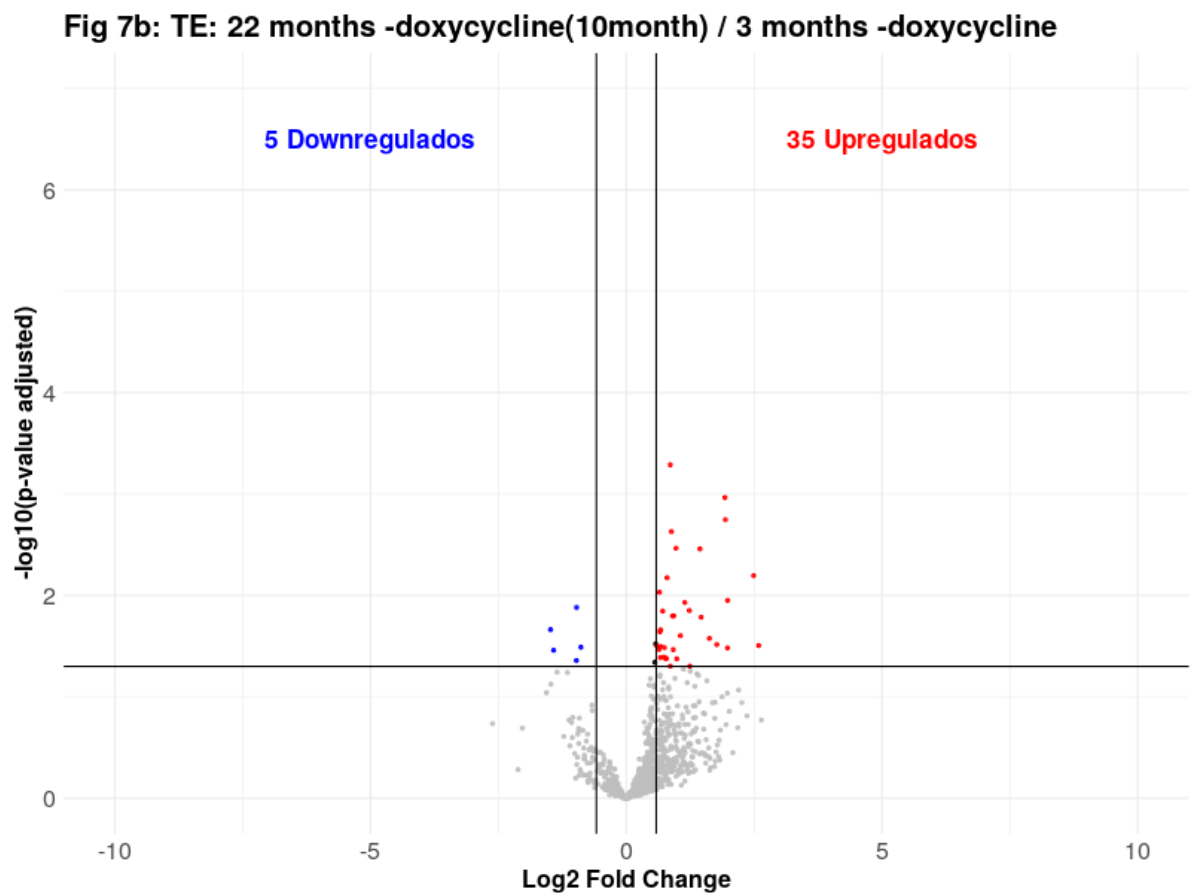
### 6.3.2. Comparación usando Volcano Plot de TEs en envejecimiento (muestras viejas vs jóvenes)

En la siguiente figura se muestran dos *Volcano Plots* (Fig. 8 y Fig. 8b) que ilustran la diferencia en la expresión de Elementos transponibles cuando se compara el grupo de ratones viejos *sin* doxiciclina frente a los ratones jóvenes (3 meses, *sin* dox). Cada punto representa un TE, y el eje vertical ( $-\log_{10}$  p-valor ajustado) indica la significancia estadística, mientras que el eje horizontal ( $\log_2$ FoldChange) representa el cambio de expresión:



**Fig. 7 (26 meses sin tratamiento):**

- Muestra 9 TEs expresados “a la baja” (azul) y 30 expresados “al alza” (rojo) al comparar 26m–dox (1 mes) vs 3m–dox.
- Indica que, tras un mes de tratamiento, sigue habiendo un número moderado de TEs alterados entre las cohortes jóvenes y viejas no tratadas.



**Fig. 7b (22 meses, sin tratamiento):**

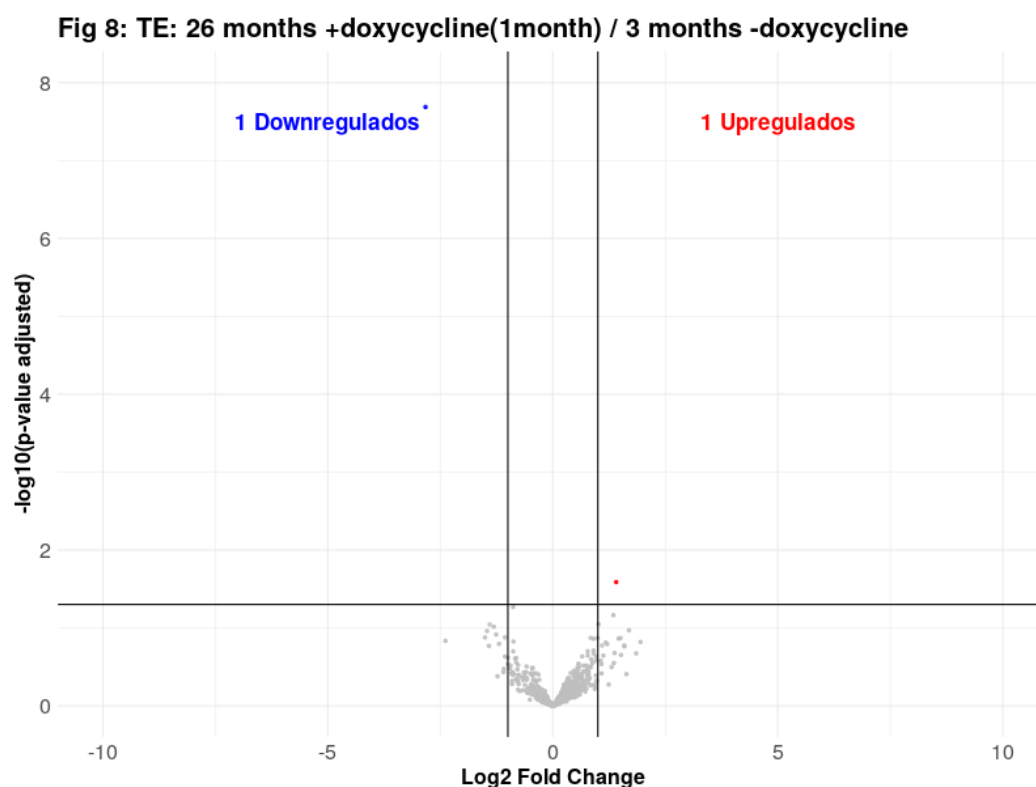
- Se observan 5 TEs expresados “a la baja” y 35 expresados “al alza” en 22m – dox frente a 3m–dox.
- El total de elementos significativos es parecido (40 vs. 39), mostrando que la divergencia respecto a jóvenes se mantiene en varios TEs, aunque con una proporción algo distinta entre extrados “a la baja” y “al alza”.

### 6.3.3. Análisis Volcano Plot de Elementos transponibles: tratamiento corto (1 mes) vs. largo (10 meses)

Además de los PCA, se generaron *Volcano Plots* (Fig. 7 y Fig. 7b) para visualizar los cambios específicos en *Elementos transponibles*. Estas gráficas reflejan la relación entre el nivel de significancia y la magnitud del cambio (Fold Change) entre muestras. Se comparan los siguientes grupos:

#### 1. Jóvenes sin dox (Young) vs. Viejos con dox (Old +dox)

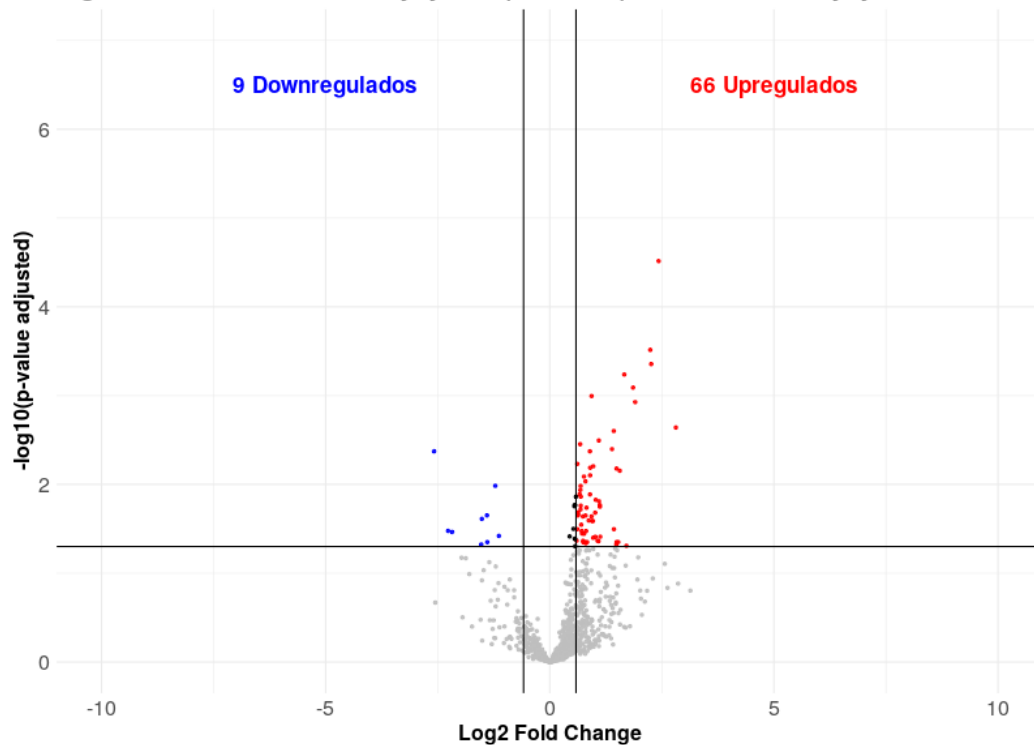
De este modo, podemos ver cuántos TEs se “revierten” o “restauran” con la reprogramación parcial.



#### Tratamiento de 1 mes (Fig. 8)

- Apenas se detectan 1-2 TEs significativos, lo cual sugiere que **el perfil de TEs en ‘Old+dox (1 mes)’ se parece mucho al de los ratones jóvenes**, es decir, la reprogramación corta habría “corregido” la mayoría de diferencias que se veían con el envejecimiento.

**Fig 8b: TE: 22 months +doxycycline(10month) / 3 months -doxycycline**



### **Tratamiento de 10 meses (Fig. 8b)**

Se identifican más TEs significativos (9 expresados “a la baja” y 66 expresados “al alza”). Esto puede interpretarse como un impacto a nivel transcritómico más amplio que puede estar modulando otras vías que promueven la derepresión de otras familias de TEs. También puede verse como que la condición ‘Old + dox (10 meses)’ está algo más alejada de ‘Young’ que en el caso de 1 mes, dado que hay más TEs alterados.

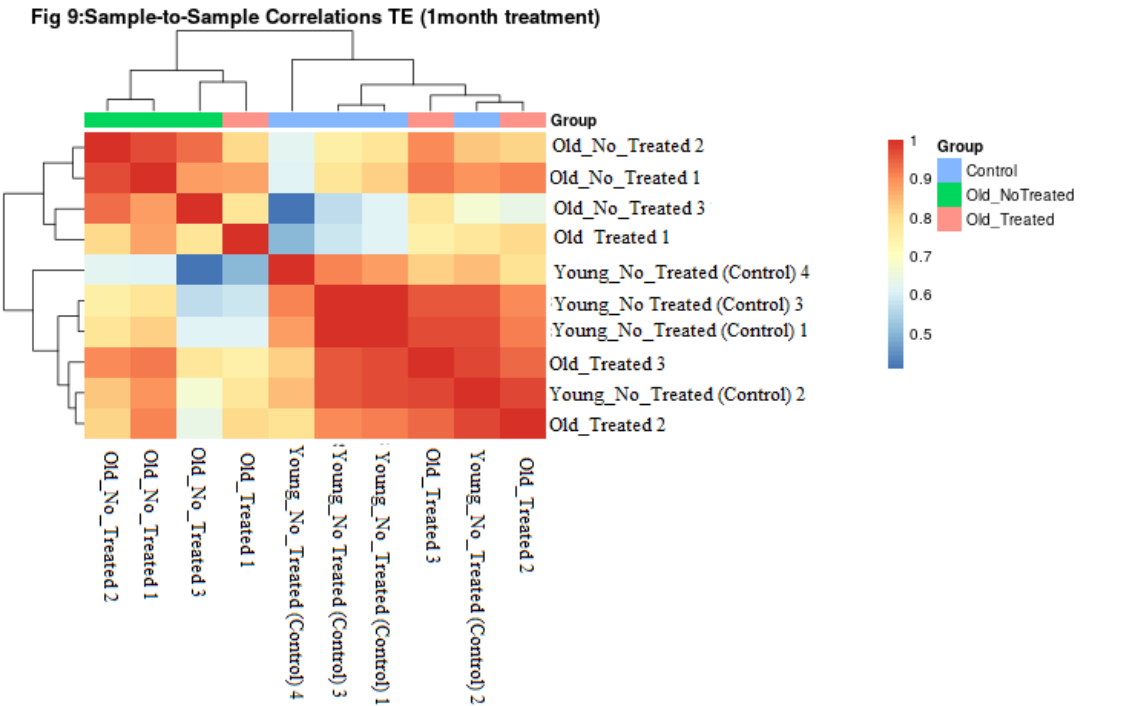
Es decir, el hecho de encontrar muy pocos TEs diferencialmente expresados en el tratamiento corto, comparando directamente ‘Young’ vs. ‘Old + dox (1 mes)’, puede interpretarse como un excelente indicio de rejuvenecimiento: las células viejas, tras un mes de reprogramación, se asemejan casi por completo a las jóvenes a nivel de TEs. Por contra, el tratamiento prolongado (10 meses) podría conllevar cambios adicionales (positivos o negativos) seguramente por familias de TEs que se desprimen por la modulación de otras vías por parte de la expresión a tiempos más largos de OSKM

En conjunto, estos resultados no significan que el protocolo de 10 meses “funcione peor”, sino más bien que el de 1 mes, en este tejido concreto y en la comparación de TEs, ofrece un patrón muy similar a jóvenes (menos TEs alterados). Ello es coherente con la idea de que, si el objetivo es “acercarse a la

condición joven”, tener pocos TEs diferencialmente expresados en la comparación final (‘Young vs. Old+dox’) podría ser una medida de éxito.

### 6.3.4. Heatmaps de correlaciones entre muestras ( con 1 mes y 10 meses de tratamiento)

Para estimar la similitud a nivel transcriptómico en la expresión de *Elementos transponibles* entre réplicas y condiciones, se construyeron dos *heatmaps* de correlación (Fig. 9 y Fig. 9b). Cada celda refleja el coeficiente de correlación (Pearson) entre muestras, con colores más cálidos indicando correlaciones más altas.



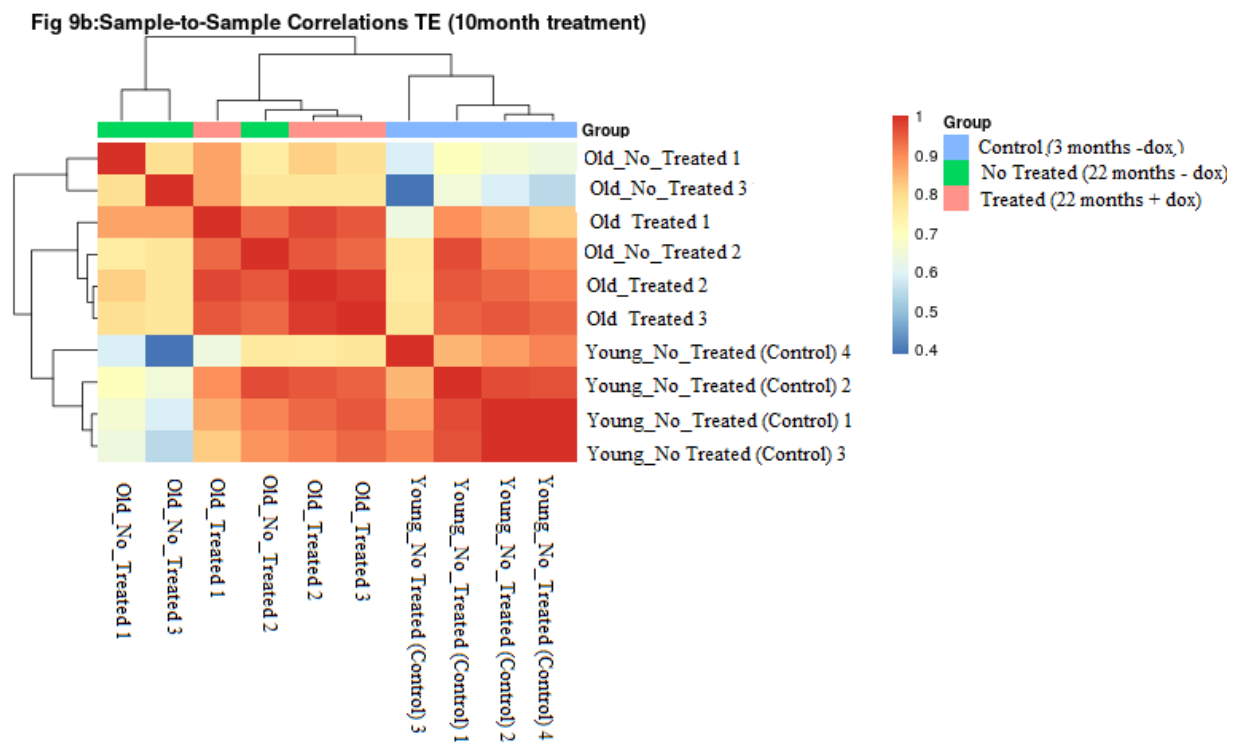
**Fig. 9 (1 mes)**

En la parte superior, las muestras *Control* (azul) suelen agruparse juntas.

Las réplicas *Old\_Treated* (rojo) muestran, en varios casos, valores de correlación que se acercan a los de los *Controles* (jóvenes), mientras que *Old\_NoTreated* (verde) conserva un perfil más diferenciado, estando dentro de lo esperado.



Esto sugiere que, incluso con tratamientos cortos (1 mes), las muestras presentan unos patrones transcriptómicos con una mayor similitud a un fenotipo joven, poniendo de manifiesto la viabilidad de la técnica de pSCR.



- **Fig. 9b (10 meses Tratamiento)**

- Continúa observándose un bloque en el que las muestras tratadas aparecen algo más cercanas a los controles que las no tratadas.
- Aunque no se produce un solapamiento total, se ve una tendencia a que *Old\_Treated* (rojo) se agrupe entre sí y, en ciertos casos, más próximo a *Control* (azul) que *Old\_NoTreated* (verde).
- Esto es coherente con la idea de que la reprogramación parcial introduce cambios que reducen la brecha entre viejo y joven.

En conjunto, ambos heatmaps **muestran que muchas réplicas tratadas tienden a correlacionarse más con los controles que con las no tratadas**, lo cual es indicio de un cierto “rejuvenecimiento” a nivel de TEs. Aun así, no todos los

ejemplares se comportan de forma idéntica. En cualquier caso, la tendencia a agrupar los *Old\_Treated* más cerca de *Control* refuerza la hipótesis de que la reprogramación parcial, incluso a corto plazo, **puede disminuir las diferencias transcripcionales** típicas del envejecimiento, al menos a nivel de TEs.

### 6.3.5. Heatmaps de TEs seleccionados con 1 mes de tratamiento y su comportamiento con 10 meses de tratamiento

A fin de comprobar si los Elementos transponibles que mostraron diferencias significativas tras 1 mes de tratamiento mantienen algún patrón en el estudio de 10 meses de tratamiento, se elaboraron dos *heatmaps* (Fig. 10 y Fig. 10b). En el primero (Fig. 10) se listan los TEs diferencialmente expresados entre Control y Old\_NoTreated (26m - dox) al cabo de 1 mes, y en el segundo (Fig. 10b) se visualiza la expresión de **esos mismos TEs** en la cohorte de 22 meses (con y sin tratamiento).

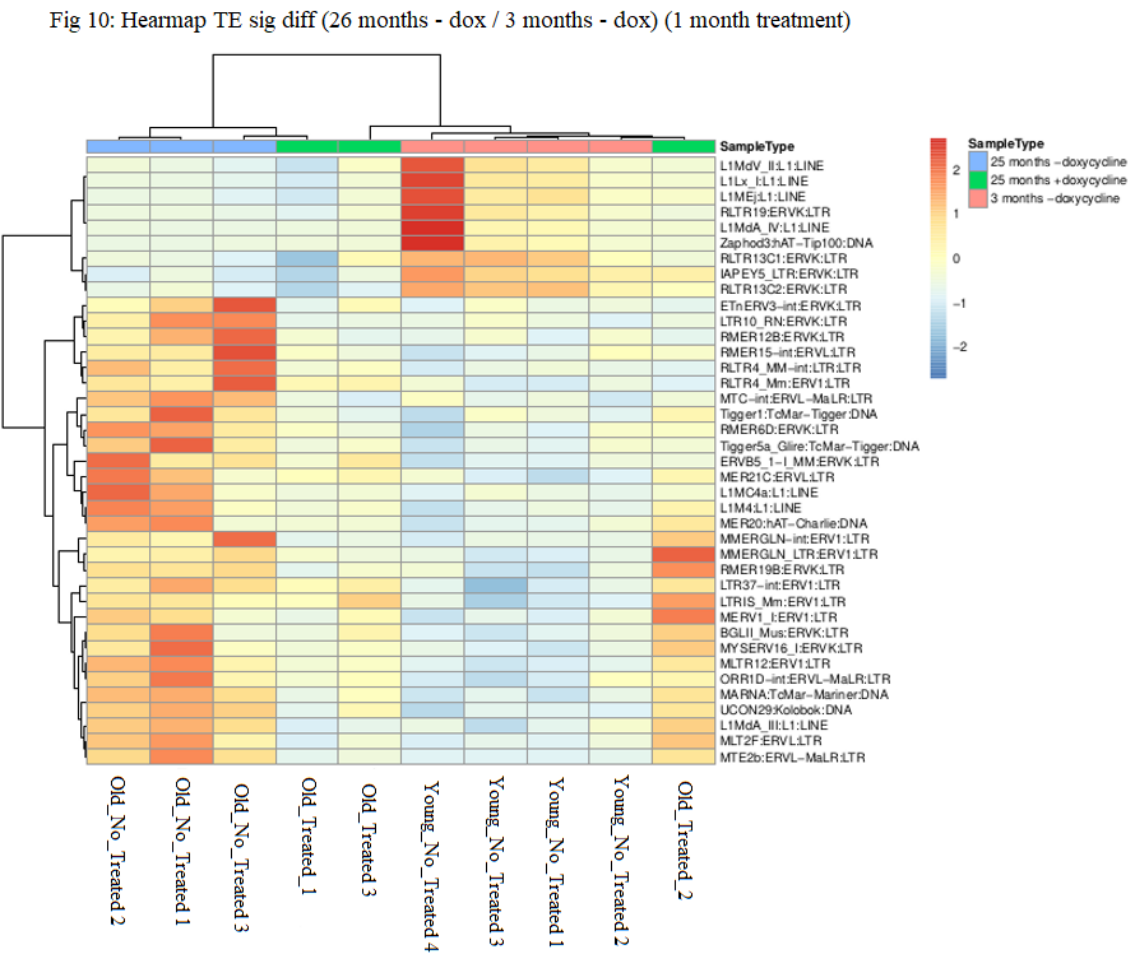


Fig. 10 (1 mes de tratamiento)

Muestra los TEs con cambios más notorios entre 3m-dox (controles) y 26m-dox (viejos no tratados).

Se aprecia un buen clustering entre muestras jóvenes y viejas tratadas, ya que presentan una buena correlación en la mayoría de los TEs.

La escala de colores representa la intensidad de la expresión normalizada, destacando cuáles están sobre-expresados (rojos) o sub-expresados (azules) respecto a la media.

Fig 10 b: Heatmap TE (10 months treatment) using TEs from 1 month treatment

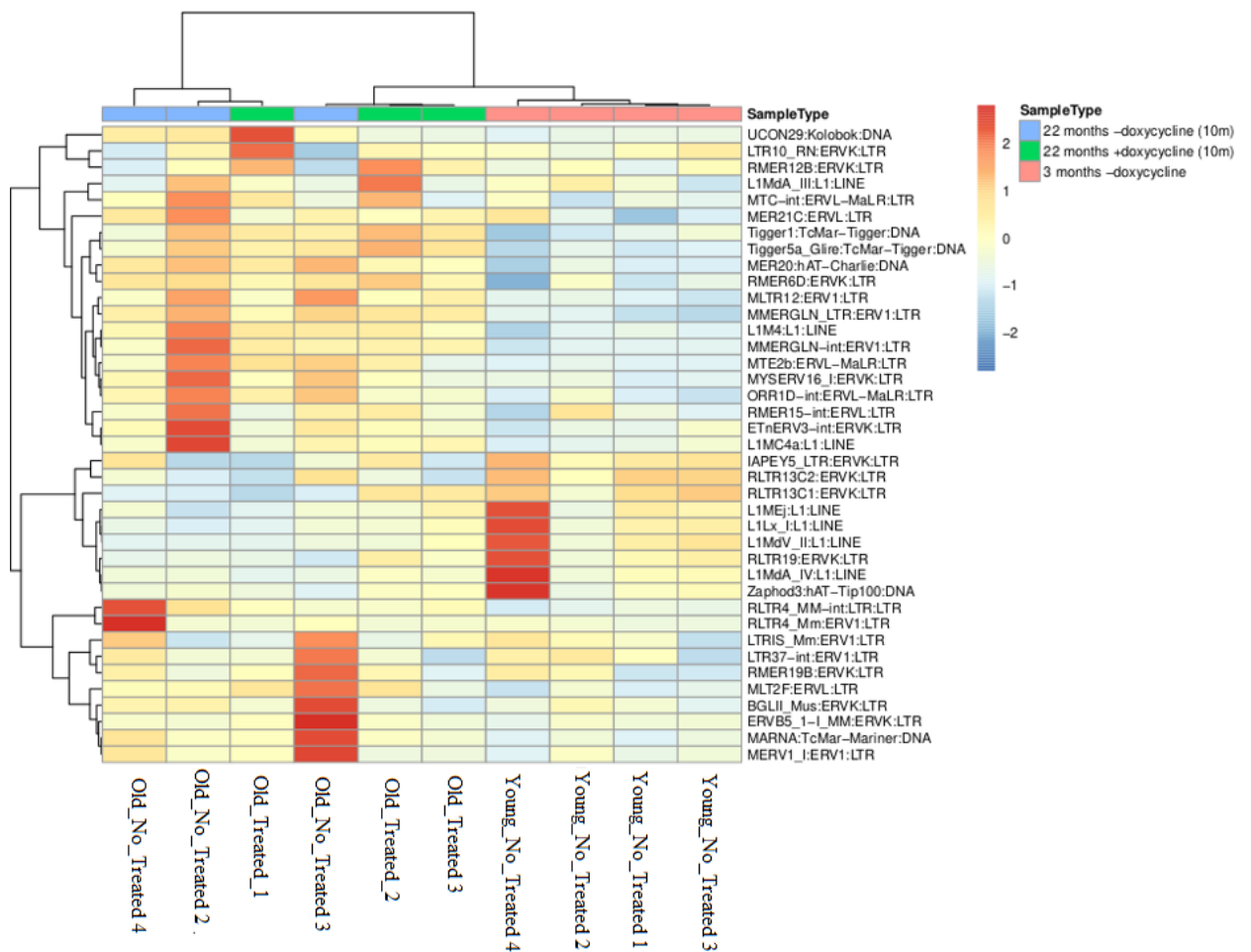


Fig. 10b (10 meses), usando los TEs del 1 mes

Se toma la misma lista de TEs *diferencialmente expresados* en el análisis de 1 mes para inspeccionarlos en el contexto de 10 meses, tanto en “viejos no tratados” como en “viejos tratados”.

El objetivo es ver si esos TEs que mostraban diferencias claras al principio siguen presentando una expresión alterada, se revierten parcialmente con el tratamiento prolongado o muestran un patrón diferente.

### **Justificación de este enfoque:**

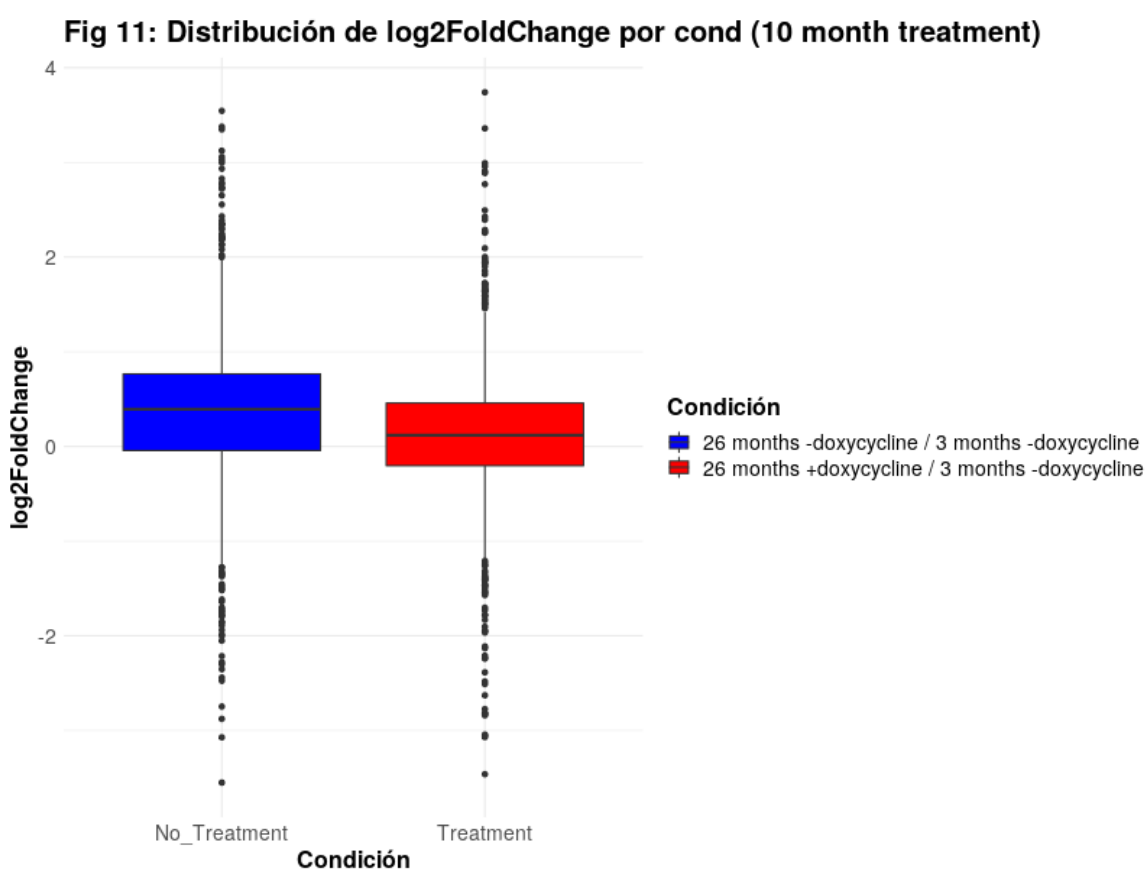
Al focalizar el análisis en los TEs que ya habían sido identificados como alterados en el corto plazo (1 mes), podemos comprobar si se mantienen las mismas tendencias, si se agravan o si se corrigen al cabo de 10 meses de reprogramación. Así, se evalúa la persistencia de la firma transcripcional en TEs “críticos” y se detectan posibles efectos tardíos del tratamiento.

### **Observaciones principales:**

- En general, algunos TEs que aparecían fuertemente sobre-expresados en “Old no tratado” conservan patrones similares o ligeramente reducidos en “Old tratado”, lo que sugeriría cierta *reversión parcial* de su expresión.
- Otros TEs apenas varían entre los tratamientos corto (1 mes) y largo (10 meses), lo que indica que el tratamiento a largo plazo, al contrario que el de corto plazo, es incapaz de promover su reversión a unos niveles de expresión similares a muestras jóvenes.
- Tal y como se aprecia en el heatmap, un tratamiento largo provoca una mayor variabilidad a nivel de control transcripcional de los TEs que en tratamientos cortos. Esto se aprecia claramente en el clustering, donde en tratamientos largos las muestras jóvenes cluterizan entre si y separadas de las tratadas, mientras que en tratamientos cortos (1 mes) las muestras jóvenes y viejas tratadas clusterizan entre ellas y aparecen intercaladas dentro del mismo cluster.

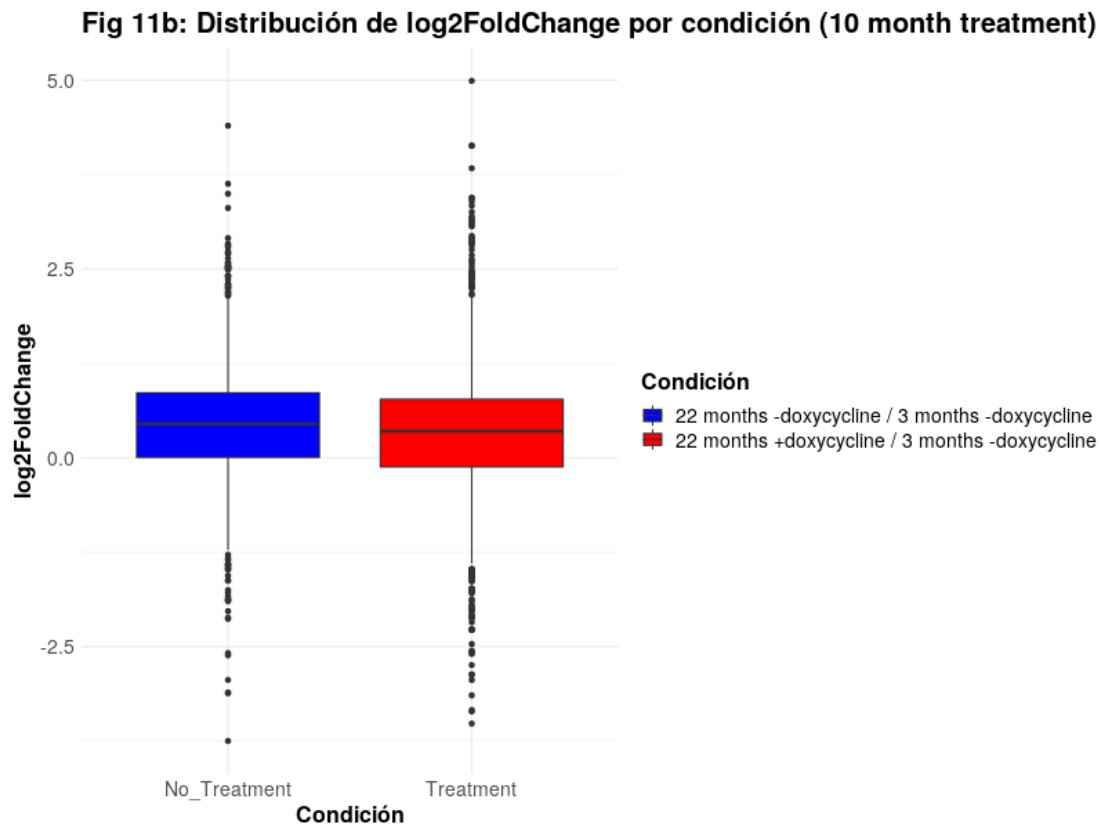
### 6.3.6. Boxplots de la distribución de log2FoldChange (1 mes y 10 meses)

Para comparar de forma global cómo varía la expresión de *Elementos transponibles* entre la condición **No\_Treatment** y la condición **Treatment**, se elaboraron dos boxplots (Fig. 11 y Fig. 11b). El eje vertical representa la log2FC en la comparación “viejo / joven”, mientras que el eje horizontal distingue las dos condiciones de viejo (sin tratar vs. tratado).



**Fig. 11 (1 mes)**

- La mediana de “No Tratados” (azul) se sitúa ligeramente por encima de 0, y la de “Tratados” (rojo) se acerca un poco más a la franja de 0, con algunos valores atípicos en ambos extremos.
- Esto parece indicar que, tras 1 mes de reprogramación parcial, muchos TEs mantienen cambios en su expresión cercanos a cero (sin grandes desviaciones), reforzando la idea de que las diferencias con respecto a los controles jóvenes se reducen en la cohorte tratada.



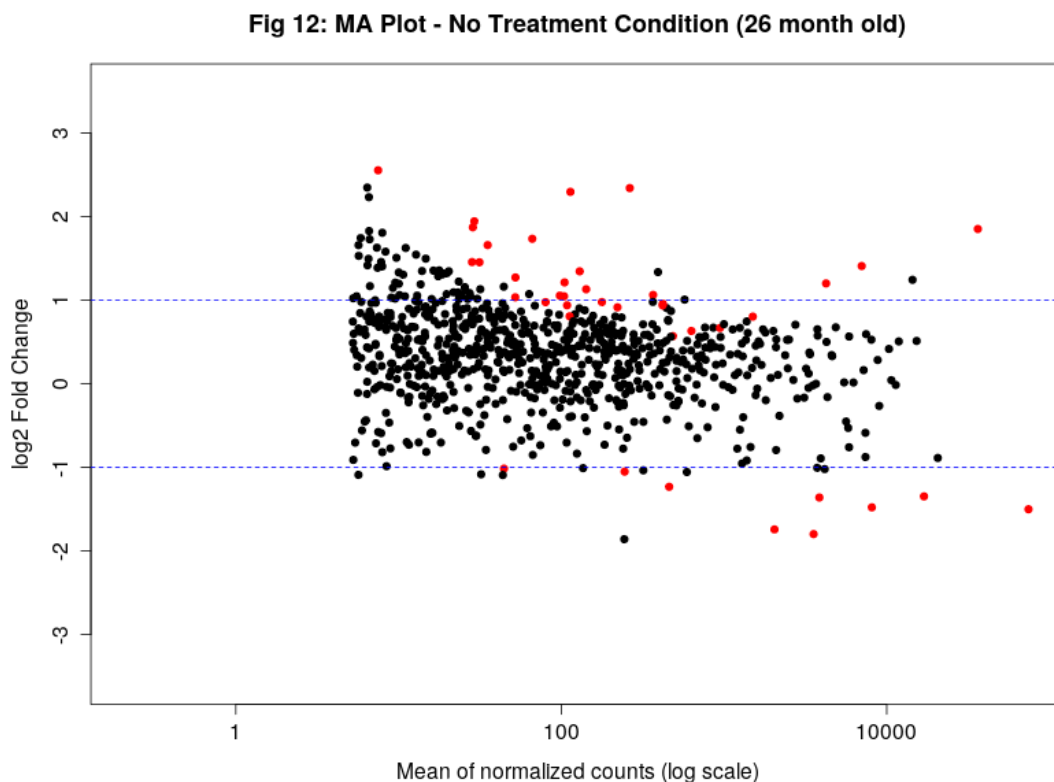
**Fig. 11b (10 meses)**

- Ambas condiciones (no tratado vs. tratado) presentan una dispersión similar, aunque la mediana en “Tratados” (rojo) se observa más cercana a cero que en “No Tratados” (azul).
- Si bien no es un desplazamiento excesivo, sí sugiere que el protocolo más prolongado introduce cambios en varios TEs que podrían acercarse algo más a valores similares a los controles jóvenes. Al contrario que en el tratamiento corto, donde se induce una gran reversión a nivel transcripcional de los TEs, en el tratamiento largo esta reducción es mucho menos marcada.

En conjunto, estos boxplots **muestran una tendencia a que la condición “Tratados” presente valores de log2FC algo más próximos a cero**, lo cual coincide con la hipótesis de un efecto de rejuvenecimiento a causa de la reprogramación parcial en la expresión de TEs. Aun así, los márgenes de dispersión y la presencia de outliers indican que no todos los elementos responden de manera uniforme, existiendo cierta variabilidad tanto en 1 mes como en 10 meses. En cualquier caso, el tratamiento corto parece tener un efecto mayor en la reversión a nivel transcripcional que el largo

### 6.3.7 MA Plots en condición No Treatment (22 meses vs. 26 meses)

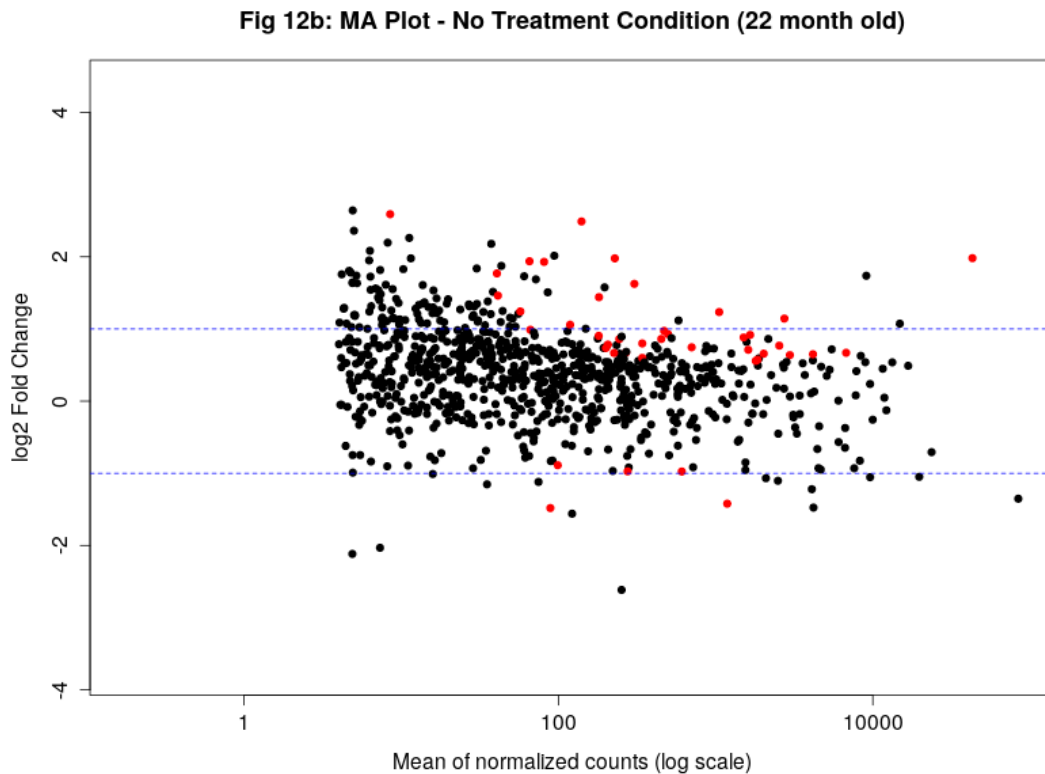
A continuación, se muestran dos *MA plots* correspondientes a ratones no tratados con diferentes edades: 22 meses (Fig. 12b) y 26 meses (Fig. 12). En ambos casos, el eje horizontal refleja la media de los conteos normalizados en escala logarítmica (mean of normalized counts, log scale), mientras que el eje vertical representa la  $\log_2FC$  de los TEs en comparación con el grupo de referencia (ratones jóvenes). Los puntos rojos indican aquellos TEs con significancia estadística ( $FDR < 0.05$ )



**Fig. 12 No Tratados, 26 meses**

- Se aprecia un núcleo central de puntos alrededor de  $\log_2FC=0$ , evidenciando que la mayoría de TEs no muestran cambios drásticos respecto a la referencia.
- Algunos TEs rojos sobresalen por encima de +1 o por debajo de -1 (líneas azules), señalando alteraciones de expresión notables en un subconjunto de elementos.
- Se puede observar como estos datos van en concordancia con los obtenidos en los análisis por Volcano Plots.





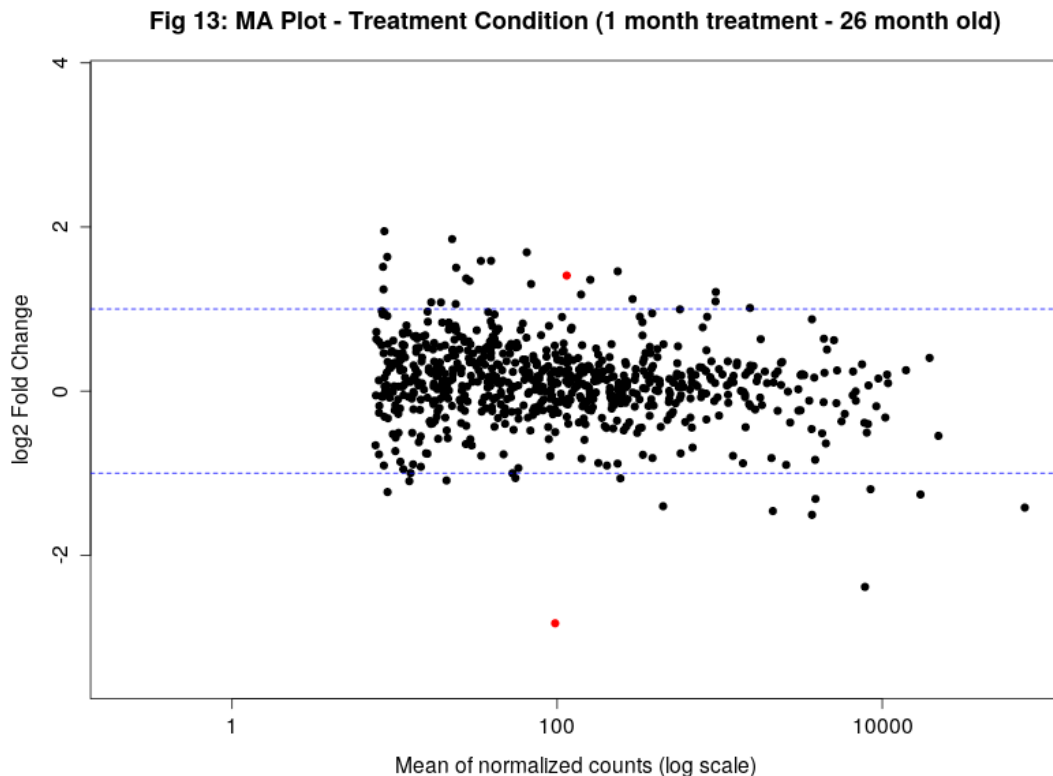
**Fig. 12b No Tratados, 22 meses**

- Globalmente, la dispersión sigue un patrón similar, con la mayoría de TEs cercanos a  $\log_2FC=0$  y unos cuantos con valores extremos (positivos y negativos).
- Al comparar con 26 meses , no se observa una diferencia masiva en la magnitud global de los cambios, aunque podría inferirse que a 26 meses se vean algunos TEs algo más desviados (por la edad algo más avanzada).

En conjunto, estos MA plots **muestran que, sin tratamiento, tanto a los 22 meses de edad como a los 26 meses existe un número de TEs fuertemente alterados**, con valores que oscilan entre +1 y +3 de  $\log_2FC$ . La derepresión de los TEs es similar en ambas condiciones ,cuyos datos se correlacionan con los obtenidos anteriormente en los volcano plots.

### 6.3.8. MA Plots en condición Treatment (1 mes vs. 10 meses)

A continuación, se muestran los MA plots de la condición tratada en dos escenarios de edad: 26 meses (1 mes de tratamiento) y 22 meses (10 meses de tratamiento).



**Fig. 13 (Tratados, 1 mes, 26 meses de edad)**

- Se observa que la mayoría de TEs (puntos negros) están cerca de  $\log_2FC=0$ , esto es, que no cambian entre viejas tratadas y jóvenes sin tratar.
- Sólo un par de TEs (en rojo) sobrepasan la línea de  $\pm 1$ , lo que sugiere que, tras un mes de reprogramación, solo estos muestran cambios significativos en comparación con la referencia joven.
- Esto podría interpretarse como una “normalización” bastante sólida de los TEs, reduciendo drásticamente las diferencias de expresión propias de la edad.

Fig 13b: MA Plot - Treatment Condition (10 month treatment - 22 month old)

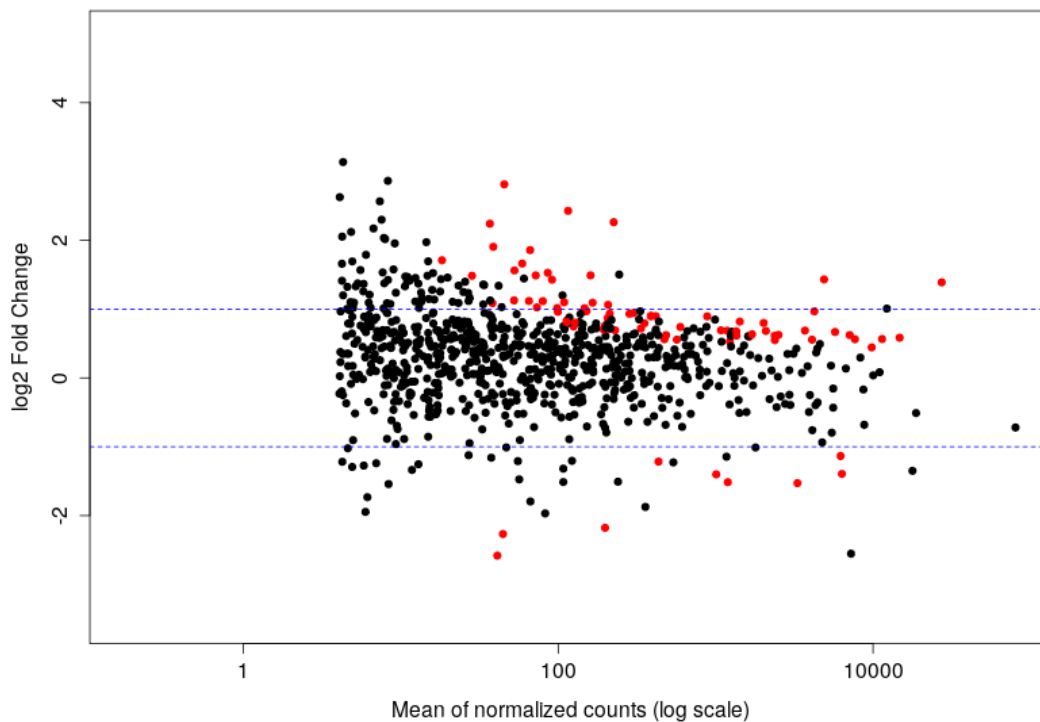


Fig. 13b (Treatment, 10 meses, 22 meses de edad)

- Se observan más puntos rojos que superan los límites de  $\pm 1$ , indicando un mayor número de TEs con cambios significativos (tanto al alza como a la baja).
- La dispersión global no es excesiva, pero sí algo mayor que en la condición de 1 mes, lo que sugiere que, a largo plazo, los mismos u otras familias de TEs pueden haberse activado o reprimido adicionalmente.

En conjunto, estos MA plots reflejan que el tratamiento ejerce un efecto notable sobre la expresión de TEs en ambos tiempos, si bien:

- **A 1 mes (26 m de edad) parece haber muy pocos TEs fuera del rango  $\pm 1$ , lo que parece indicar una reversión sólida a nivel transcripcional de los TEs a perfiles similares a muestras jóvenes.**
- **A 10 meses (22m de edad) surgen más TEs alterados, pudiendo indicar cambios más amplios (positivos o no) asociados a la reprogramación prolongada.**

## **Conclusión comparativa de MA Plots (no tratados vs. tratados, 22 vs. 26 meses)**

Al reunir todos los MA plots presentados en los apartados anteriores - tanto en condición **No Tratados** (22 y 26 meses) como en **Tratados** (1 y 10 meses) - podemos extraer las observaciones siguientes:

### **1. Condición no tratada (22 vs. 26 meses)**

- En ambos casos, la mayoría de Elementos transponibles se sitúa cerca de  $\log_2FC=0$ , con unos cuantos puntos que superan los umbrales de  $\pm 1$ .
- El salto de 22 a 26 meses no provoca, en general, un aumento masivo de TEs alterados, aunque sí se ve cierto incremento de dispersión o desviaciones en el grupo de 26 meses.

### **2. Condición tratada (1 mes vs. 10 meses)**

- **A 1 mes (26m old)**, muy pocos TEs muestran  $|\log_2FC| < 1$ . Esto sugiere que la expresión de TEs en los ratones “Old + dox (1 mes)” queda bastante cerca del patrón juvenil (pocos cambios residuales).
- **A 10 meses (22m old)**, se identifica un número mayor de TEs significativamente regulados (arriba o abajo), lo cual refleja un efecto más amplio o complejo de la reprogramación prolongada. No implica necesariamente que sea “peor”; simplemente, se han producido alteraciones adicionales en el patrón de expresión de TEs que pueden distanciar algo más el perfil de TEs del estrictamente “joven”.

### **3. Comparando “No Tratados” vs. “Tratados”**

- Respecto a las cohortes no tratadas, los ratones tratados (a 1 o 10 meses) suelen presentar menor desviación global en muchos TEs cuando se comparan con el grupo joven, lo que apunta a un alto grado de “restauración” de la expresión.
- Sin embargo, la “magnitud” de esa restauración difiere: a 1 mes se ve un perfil muy parecido al joven en la mayoría de TEs (muy pocos *significativos*), mientras que a 10 meses surgen más TEs con cambios notables, posiblemente asociados a una remodelación epigenética provocada por el tratamiento a largo plazo con OSKM.

## Interpretación final

- El tratamiento de **1 mes** exhibe pocos TEs alejados  $\log_2FC=0$ , lo que sugiere un mayor parecido al perfil juvenil que el tratamiento a largo plazo.
- Si, en cambio, se considera la complejidad de cambios introducidos: El tratamiento a largo plazo (10 meses) puede ejercer efectos adicionales (o divergentes) en un subconjunto mayor de TEs.

En síntesis, **tanto en los grupos de 22 como de 26 meses tratados, la reprogramación parcial reduce la proporción de TEs muy desviados con respecto a los jóvenes**, pero la forma exacta en que estos cambios se mantienen o amplían con el tiempo (1 vs. 10 meses) puede variar según la edad inicial y el propio impacto transcripcional de OSKM en otras vías o procesos.

## 7. Discusión

En conjunto, los resultados sugieren que **la reprogramación parcial** es capaz de revertir parcialmente la desregulación de Elementos transponibles asociada a la edad en ratones, tanto en tratamientos a corto (1 mes) como a largo plazo (10 meses). Sin embargo, las comparaciones entre ambos tratamientos revelan algunos matices importantes:

### 1. Reversión de TEs en ambos tratamientos.

- En las gráficas de volcano plots, PCA y heatmaps se observa que, con tratamiento (OSKM), muchos TEs dejan de estar significativamente alterados en comparación con los controles jóvenes. Esto indica que, en líneas generales, la reprogramación consigue ‘corregir’ parte de la expresión anómala vinculada al envejecimiento.
- Tal reversión se aprecia en las condiciones de 1 mes y también en la de 10 meses, lo que sugiere que el protocolo de reprogramación, independientemente de su extensión, ejerce un efecto notable en algunos TEs.

### 2. Reversión de los perfiles transcripcionales más efectivo en los tratamientos a corto plazo.

- En varias de las figuras, la cohorte tratada durante 1 mes presenta muy pocos TEs diferencialmente expresados respecto a los jóvenes, lo que puede interpretarse como un gran acercamiento al perfil juvenil.
- En cambio, el tratamiento prolongado (10 meses, iniciado a 12 meses y examinado a 22) muestra un número más amplio de TEs alterados. Aunque esto no implica que “funcione peor”, sí revela una expresión más divergente de la juvenil para algunos elementos repetitivos.

### 3. Posibles causas de las diferencias.

- **Edad distinta en cada experimento:** En el tratamiento corto, los ratones parten de 26 meses cuando se inicia la reprogramación, mientras que en el de 10 meses se empieza a los 12 y se analiza a los 22. Por tanto, no se trata de condiciones

idénticas. La variación de la edad inicial y final puede influir en cómo responden los TEs a la reprogramación.

- **Efectos adicionales por una reprogramación más prolongada:** Cuanto más tiempo se expresan los factores OSKM, más vías podrían activarse o reprimirse, generando cambios en los patrones transcripcionales de TEs. Algunos de estos cambios pueden ser positivos (por ejemplo, rejuvenecer otros procesos) o no deseados (divergir del perfil típicamente “joven”).

En conclusión, los datos de TE apuntan a que el tratamiento corto (1 mes) alcanza un patrón muy próximo al de animales jóvenes, mientras que el prolongado (10 meses) podría incluir modificaciones adicionales que no siempre conducen a una expresión idéntica a la juvenil en este aspecto concreto. Sin embargo, **Browder et al. (2022)** describieron que, a nivel de expresión génica y otros marcadores, el protocolo largo resultaba más efectivo para frenar los signos de envejecimiento que el corto. Esto sugiere que, si bien **nuestros resultados indican que la regulación de TE parece ser más favorable en el tratamiento corto**, el protocolo de 10 meses podría conllevar **beneficios adicionales** en otros procesos celulares o tisulares que no se ven reflejados en este análisis específico de TE. Por tanto, **ambas duraciones revierten parcialmente la expresión asociada a la edad**, pero sus efectos finales varían según la edad de inicio, la duración y el tipo de marcadores (genes, TEs, etc.) que se examinen.

## 8. Conclusiones

- Tanto el protocolo de reprogramación parcial de 1 mes como el de 10 meses son capaces de revertir parcialmente la expresión anómala de diversos TEs, acercando en cierta medida las muestras viejas a patrones de expresión más similares a jóvenes.
- Nuestros datos indican que el tratamiento corto (1 mes) arroja un perfil de expresión de TEs más similar al juvenil (muy pocos elementos alterados), mientras que en tratamientos más largos (10 meses) se provoca una desregulación más amplia de TEs.
- La disparidad entre tratamientos puede obedecer a que en una reprogramación parcial prolongada, se activen mecanismos adicionales, que no siempre se encuentran en línea con el estado de ratones jóvenes.
- Futuras investigaciones deberían profundizar en cómo la edad inicial, la duración de la expresión de OSKM y la interacción de estos factores con otros procesos epigenéticos condicionan la restauración, o incluso el sobreajuste, del perfil de TEs en el envejecimiento y rejuvenecimiento.



## • 9.Bibliografía

1. **Takahashi, K. & Yamanaka, S.** (2006). *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.* **Cell**
2. **Ocampo, A. et al.** (2016). *In vivo amelioration of age-associated hallmarks by partial reprogramming.* **Cell**
3. **Browder et al.** (2022). *In vivo partial reprogramming alters age-associated molecular changes during physiological aging in mice.* **Nature Aging**
4. **Sarkar, T. J. et al.** (2020). *Transient non-integrative expression of nuclear reprogramming factors promotes multifaceted amelioration of aging in human cells.* **Nature Communications**
5. **Simon, M., et al.** (2019). *LINE1 Derepression in Aged Wild-Type and SIRT6-Deficient Mice Drives Inflammation.* **Cell Metabolism.**
6. **Jin Y, et al.** (2015) TEtranscripts: a package for including transposable elements in differential expression analysis of RNA-seq datasets. **Bioinformatics.**

## 10. Anexos

**TE Diferencialmente expresados con  $FDR < 0.05$ .**

*Tratamiento 1 mes: (26 months +dox) / 3months -dox*

	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj
LTR82A:ERV1:LTR	97.2033392	-2.83041631	0.41568707	6.80900739	9.83E-12	2.05E-08
LTRIS_Mm:ERV1:LTR	114.448224	1.40791393	0.39608788	3.55454939	0.00037863	0.02579879

*Tratamiento 10 mes: (22 months +dox) / 3months -dox (partimos de ratones 12 meses de edad)*

	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj
B1F1:Alu:SINE	1639.67016	0.59939164	0.19775339	3.03100558	0.00243741	0.04308544
B1F:Alu:SINE	3696.54452	0.68818563	0.18817872	3.65708525	0.0002551	0.01041301
B1_Mur1:Alu:SINE	4098.18768	0.55627382	0.16078907	3.45964949	0.00054088	0.01704477
B1_Mur2:Alu:SINE	2509.07451	0.62546514	0.18480532	3.38445424	0.0007132	0.02070167
B1_Mur4:Alu:SINE	2379.68502	0.54934281	0.15942713	3.44572971	0.00056952	0.01762151
B3:B2:SINE	14755.0458	0.58435196	0.16477183	3.54643122	0.00039049	0.01376937
B3A:B2:SINE	7678.69226	0.56242999	0.18421522	3.05311356	0.0022648	0.04110003
B4A:B4:SINE	7109.39466	0.62258988	0.18628721	3.34209682	0.00083148	0.02237558
Charlie10:hAT-DNA	45.4601422	2.81304764	0.67230598	4.1841776	2.86E-05	0.00228647
Charlie12_Rodent:hAT-Charlie:DNA	201.484241	0.76253607	0.20330254	3.75074547	0.00017631	0.00815811
Charlie1:hAT-Charlie:DNA	127.533539	0.78616213	0.26136441	3.00791574	0.00263046	0.04466811
Charlie1a:hAT-Charlie:DNA	230.148601	0.69230875	0.19510529	3.54838531	0.0003876	0.0137149
ERV5_1-LTR_MM:ERV1:LTR	198.507727	-	0.69356205	3.14093613	0.00168409	0.03433994

	151.454		0.25232	3.84210	0.00012	0.00625
HAL1:L1:LINE	143	0.96945956	482	945	198	254
	225.268		0.48768	4.64052		0.00044
IAP-d-int:ERVK:LTR	936	2.2631123	429	741	3.48E-06	146
	212.157		0.22577	3.15665	0.00159	0.03347
ID2:ID:SINE	864	0.71268947	331	957	588	574
	1704.08		0.18915	3.35567	0.00079	0.02179
ID4_:ID:SINE	774	0.63474126	446	703	171	279
	417.087		0.25176	3.56580	0.00036	0.01296
ID:ID:SINE	341	0.8977598	92	478	274	502
	11412.8		0.16365	3.45719	0.00054	0.01714
ID_B1:B4:SINE	049	0.5657707	014	653	583	784
	196.247		0.22167	3.32660	0.00087	0.02292
L1M3:L1:LINE	465	0.73742331	447	46	911	91
	389.058		0.23517	3.82736	0.00012	0.00649
L1M4:L1:LINE	883	0.90009379	333	343	952	267
	91.3758		0.34373	4.15480		0.00250
L1MB1:L1:LINE	294	1.42815363	558	3	3.26E-05	32
	212.529		0.28055	3.32629	0.00088	0.02292
L1MB4:L1:LINE	971	0.93319429	04	817	008	91
	283.540		0.21082	4.42167		0.00101
L1MB5:L1:LINE	09	0.93218256	135	07	9.79E-06	166
	353.353		0.21442	3.70713	0.00020	0.00923
L1MB7:L1:LINE	863	0.7949054	598	194	962	953
	335.410		0.22998	3.12534	0.00177	0.03572
L1MB8:L1:LINE	77	0.71878861	715	243	598	813
	125.378		0.24859	3.00770	0.00263	0.04466
L1MC1:L1:LINE	892	0.74770776	708	938	225	811
	206.077		0.26447	3.28546	0.00101	0.02548
L1MC3:L1:LINE	068	0.86892752	589	973	812	677
	484.527		0.18402	3.37490	0.00073	0.02085
L1MC4:L1:LINE	025	0.62105313	119	004	843	949
	113.297		0.27659	3.00942	0.00261	0.04466
L1MD3:L1:LINE	481	0.83237969	113	294	744	811
	147.254		0.29991	3.37827	0.00072	0.02083
L1MD:L1:LINE	738	1.01319683	505	944	941	502
	38.2047		0.35908	3.02528	0.00248	0.04360
L1ME3:L1:LINE	805	1.08633451	555	046	403	8
	73.2528		0.29150	3.51800	0.00043	0.01489
L1ME3A:L1:LINE	979	1.02553226	924	943	48	525
	38.6941		0.43540	4.37629		0.00118
L1ME4c:L1:LINE	056	1.90546894	689	487	1.21E-05	225
	4240.33		0.31554	3.06837	0.00215	0.03990
L1MdA_:L1:LINE	183	0.96822198	914	149	229	808
	3313.17	-	0.51387	2.97509	0.00292	0.04739
L1_Mur1:L1:LINE	289	1.52881218	034	323	9	491
	884.156		0.22491	3.97972		0.00423
L2:L2:LINE	151	0.89508716	184	445	6.90E-05	751

	199.322		0.24488	3.12130	0.00180	0.03596
<b>L2d2:L2:LINE</b>	086	0.76436439	585	899	049	057
				-		
	6347.28	-	0.46313	3.01049	0.00260	0.04466
<b>Lx4B:L1:LINE</b>	06	1.39426818	586	5	822	811
	567.645		0.18229	3.05582	0.00224	0.04087
<b>Lx8b:L1:LINE</b>	798	0.55707264	88	178	445	57
	1231.44		0.16562	3.18708	0.00143	0.03167
<b>Lx9:L1:LINE</b>	682	0.52786817	716	709	713	272
<b>MER20:hAT-Charlie:DNA</b>	387.698		0.23885	3.76325	0.00016	0.00790
	675	0.89886045	185	513	772	352
<b>MER2:TcMar-Tigger:DNA</b>	596.767		0.24450	3.03014	0.00244	0.04316
	799	0.74087634	199	446	437	19
<b>MER3:hAT-Charlie:DNA</b>	194.631		0.21692	3.23478	0.00121	0.02845
	719	0.70170009	32	586	734	376
<b>MER5A1:hAT-Charlie:DNA</b>	99.5030		0.29360	3.27652	0.00105	0.02586
	078	0.96201074	73	189	094	505
	85.8615		0.50733	3.01112	0.00260	0.04465
<b>MER74B:ERV:LTR</b>	444	1.52764539	399	371	283	859
			0.20084	3.41362	0.00064	0.01916
<b>MIR3:MIR:SINE</b>	1186.31	0.68560423	317	979	104	736
	2086.94		0.18903	3.60992	0.00030	0.01153
<b>MIR:MIR:SINE</b>	438	0.68238561	056	218	629	632
	160.665		0.49519	3.01008	0.00261	0.04466
<b>MLT2F:ERV:LTR</b>	966	1.49058979	836	63	173	811
<b>MMERGLN-int:ERV1:LTR</b>	115.616		0.46051	5.27276		
	219	2.42816656	129	227	1.34E-07	3.05E-05
<b>MMERGLN_LTR:ERV1:LTR</b>	66.3331		0.41527	4.47323		0.00081
	208	1.85763145	68	676	7.70E-06	222
	472.752		0.19036	2.95299	0.00314	0.04970
<b>MT2B:ERV:LTR</b>	225	0.5621541	747	462	707	191
<b>ORR1A1-int:ERV:MaLR:LTR</b>	299.970		0.28733	3.27880	0.00104	0.02575
	653	0.94210094	082	222	249	745
				-		
<b>OldhAT1:hAT-Ac:DNA</b>	6224.77	-	0.36650	3.09406	0.00197	0.03798
	977	1.13398904	442	646	433	594
	1081.95		0.20052	3.45030	0.00055	0.01735
<b>PB1:Alu:SINE</b>	704	0.69185604	032	396	996	184
	5741.42		0.18706	3.56965	0.00035	0.01287
<b>PB1D10:Alu:SINE</b>	593	0.66775125	307	825	745	062
	1352.91		0.16782	4.04103		0.00352
<b>PB1D11:Alu:SINE</b>	096	0.678204	936	318	5.32E-05	226
	2373.87		0.19274	3.18143	0.00146	0.03196
<b>PB1D7:Alu:SINE</b>	735	0.61320418	43	869	546	416
	109.189		0.31372	3.50174	0.00046	0.01547
<b>RLTR12A:ERV:LTR</b>	689	1.09857132	121	389	222	201
<b>RLTR13B3:ERV:LTR</b>	207.319		0.35018	3.03266	0.00242	0.04292
<b>R</b>	246	1.06200083	755	301	406	999

				-		
RLTR13C2:ERVK:LTR	433.864	-	0.33226	3.65910	0.00025	0.01037
R	325	1.21580103	691	958	309	327
RLTR17B_Mm:ERV	2018.27		0.23914	3.34071	0.00083	0.02240
K:LTR	335	0.79891207	403	508	563	628
RLTR20B1:ERVK:LTR	52.4439		0.36568	3.08152	0.00205	0.03886
R	872	1.12686904	528	692	942	651
RLTR42-	113.472		0.25687	3.15454	0.00160	0.03354
int:ERVK:LTR	709	0.81033438	845	406	749	735
				-		
	41.0717	-		3.98047		0.00423
RLTR44B:ERVK:LTR	222	2.58185334	0.64863	168	6.88E-05	693
				-		
	44.5745	-	0.71830	3.15776	0.00158	0.03338
RLTR46A:ERVK:LTR	697	2.26824441	607	867	982	288
	18.2816		0.57795	2.95915	0.00308	0.04908
RLTR48B:ERV1:LTR	921	1.71027133	926	551	483	266
RLTR4_MM-	27321.4		0.34700	4.00139		0.00399
int:LTR:LTR	215	1.38852124	9	831	6.30E-05	953
	71.9844		0.38999	3.81976	0.00013	0.00663
RLTR6-int:ERV1:LTR	216	1.48968805	432	856	358	086
RLTR6C_Mm:ERV1:	4889.87		0.45006	3.18032	0.00147	0.03196
LTR	903	1.43135771	683	261	111	416
RMER12B:ERVK:LTR	1424.44		0.23864	3.43162	0.00059	0.01828
R	609	0.81893305	291	534	998	719
RMER16-	165.543		0.26859	4.07028		0.00320
int:ERVK:LTR	399	1.09327843	97	904	4.70E-05	107
RMER16_Mm:ERVK	65.2129		0.32486	3.44074	0.00058	0.01784
:LTR	867	1.11777505	387	902	011	111
RMER17C-	127.644		0.26828	2.99189	0.00277	0.04598
int:ERVK:LTR	113	0.80267935	476	32	253	851
RMER30:hAT-	98.5687		0.32987	3.07996	0.00207	0.03897
Charlie:DNA	489	1.01600316	544	001	028	015
	9805.12		0.14374	3.08521	0.00203	0.03851
RSINE1:B4:SINE	181	0.44348882	649	499	405	889
RodERV21-	52.7421		0.41081	3.80169	0.00014	0.00701
int:ERV1:LTR	885	1.56179276	476	583	371	7
Tigger1:TcMar-	79.9259		0.32223	3.46221	0.00053	0.01703
Tigger:DNA	163	1.11565926	835	752	574	184
Tigger2b:TcMar-	28.3490		0.49911	2.97423	0.00293	0.04748
Tigger:DNA	258	1.48449305	747	58	719	732
Tigger5a_Glire:TcM	59.0940		0.36402	4.56485		0.00057
ar-Tigger:DNA	309	1.66170896	213	698	5.00E-06	755
URR1B:hAT-	1357.98		0.15908	3.86346	0.00011	0.00587
Charlie:DNA	44	0.6146206	537	408	179	747
				-		
	1009.76		0.41892	3.34485	0.00082	0.02233
X15_LINE:L2:LINE	432	-1.4012342	255	263	326	432

	1195.81	-	0.45873	3.30144	0.00096	0.02443
<b>X7A_LINE:CR1:LINE</b>	465	1.51449958	783	907	187	742
<b>hAT-N1_Mam:hAT-</b>	36.8274		0.47328	4.73582		0.00030
<b>Tip100:DNA</b>	257	2.24141367	933	128	2.18E-06	562

## Anexo 2

### Script principal TETranscript.

```
#
TEtranscripts --format BAM --stranded reverse -t
SRR17261723/SRR17261723_Aligned.sortedByCoord.out.bam
SRR17261722/SRR17261722_Aligned.sortedByCoord.out.bam
SRR17261721/SRR17261721_Aligned.sortedByCoord.out.bam -c
SRR17261749_Aligned.sortedByCoord.out.bam
SRR17261748/SRR17261748_Aligned.sortedByCoord.out.bam
SRR17261747/SRR17261747_Aligned.sortedByCoord.out.bam
SRR17261746/SRR17261746_Aligned.sortedByCoord.out.bam --GTF
Mus_musculus.GRCm39.112.gtf --TE GRCm39_Ensembl_rmsk_TE.gtf --mode
multi --sortByPos --project TFM_Javier_Lazaro
```