



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Escola Tècnica
Superior d'Enginyeria
Informàtica



Bioinformatics
Biostatistics
Unit

Príncipe Felipe
Research Center CIPF

DIPLOMA DE ESPECIALIZACIÓN EN BIOINFORMÁTICA Y BIOLOGÍA COMPUTACIONAL

**Nuevas Estrategias Computacionales para la Identificación de
miARN como Factores del
Diagnóstico en Melanoma**
Trabajo De Fin de Diploma

Helena Gómez Martínez

Valencia, enero 2022

Directores:

Francisco García García

Adolfo López Cerdán

RESUMEN

El melanoma es uno de los tipos de cáncer de piel más agresivos y su incidencia ha aumentado en los últimos años en todo el mundo. Entre los factores que contribuyen a la letalidad y gravedad de esta enfermedad se encuentran la aparición tardía de los primeros síntomas, la falta de tratamientos eficaces, la elevada tendencia a la metástasis y también los problemas de detección. Desgraciadamente, el diagnóstico del melanoma sigue siendo problemático en la actualidad debido a la falta de biomarcadores eficientes, que permitan la detección temprana y precisa de esta enfermedad. Es por ello por lo que la hipótesis general de este trabajo considera que un enfoque computacional integrador de todos los estudios publicados en melanoma con marcadores de miRNAs puede generar nuevas estrategias y recursos para su detección y tratamiento.

Para ello, se llevó a cabo una revisión sistemática y selección de estudios de melanoma con datos de microarrays o secuenciación masiva de miRNAs en los repositorios Gene Expression Omnibus (GEO), ArrayExpress, un análisis individual de cada estudio seleccionado y un análisis de expresión diferencial de cada uno de ellos. Por último, se realizó un metaanálisis de miRNAs. Los resultados revelaron un total de 84 miRNAs expresados diferencialmente entre tejido de melanoma y nevus.

En definitiva, este trabajo ha identificado diferencias de expresión de miRNAs en un escenario de diagnóstico de la enfermedad, abriendo la puerta a nuevas investigaciones que permitan realizar una caracterización funcional de los miRNAs significativos hallados, permitiendo una nueva perspectiva necesaria en medicina personalizada y precisión en estudios biomédicos en el campo de la investigación de melanoma.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. ¿Qué es el melanoma?.....	1
1.2. Principales factores de riesgo	1
1.3. Aspectos moleculares del melanoma	2
1.4. Detección y tratamientos.....	2
2. Hipótesis y objetivos	3
3. Material y Métodos.....	4
3.1. Estrategia computacional.....	4
3.2. Revisión sistemática y selección de estudios.....	4
3.3. Procesado de datos.....	5
3.4. Selección de los grupos de contraste.....	5
3.5. Análisis exploratorio individual de los estudios y expresión diferencial.....	6
3.6. Metaanálisis	7
4. Resultados y discusión	8
4.1. Revisión y selección de estudios	8
4.2. Análisis individual de estudios y expresión diferencial.....	9
a. E-MTAB-915	9
b. E-GEOD-18509.....	10
c. E-GEOD-34460.....	12
4.3. Metaanálisis de miRNAs.....	13
5. Discusión	15
6. Conclusiones.....	17
7. Referencias.....	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las fases de estrategia computacional planteada.....	4
Figura 2. Diagrama PRISMA empleado en la revisión sistemática de estudios.	9
Figura 3. PCA del estudio E-MTAB-915.	10
Figura 4. Boxplot después de la normalización de los datos con log2.....	11
Figura 5. PCA del estudio E-GEOD-18509.....	11
Figura 6. PCA del estudio E-GEOD-34460, contraste “Melanoma” vs. “nevus”, correspondiente al melanoma primario vs. nevus.	12
Figura 6. PCA del estudio E-GEOD-34460, contraste “Melanoma” vs. “Nevus”, correspondiente al melanoma metastásico vs. nevus.....	13

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de contraste para cada escenario.....	6
Tabla 2. Normalización de la nomenclatura para cada escenario.	6
Tabla 3. Distribución de muestras del estudio E-MTAB-915.....	9
Tabla 4. Distribución de las muestras del estudio E-GEOD-34460 para el contraste “Melanoma primario vs. Nevus”.....	12
Tabla 5. Distribución de las muestras del estudio E-GEOD-34460 para el contraste “Melanoma metastásico vs. Nevus.....	13
Tabla 6. Estudios incluidos en el escenario de diagnóstico.	14
Tabla 7. miRNAs significativos del metaanálisis de diagnóstico.	14

ABREVIATURAS

BY	Benjamini & Yekutieli (método de corrección del p-valor)
FDR	False discovery rate (método de corrección del p-valor, también BH)
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
logFC	Logaritmo de magnitud de cambio
miRNA	Micro-RNA
PCA	Análisis de Componentes Principales
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
RNA	Ácido ribonucleico

1. Introducción

1.1. ¿Qué es el melanoma?

El melanoma es el tipo de neoplasia cutánea más letal y se origina en la proliferación incontrolada de melanocitos (Linos et al., 2009), siendo su letalidad una de las más elevadas entre las neoplasias cutáneas (Noone et al., 2018).

Entre los distintos factores que contribuyen a la letalidad y gravedad de esta enfermedad se encuentran la aparición tardía de los primeros síntomas, la falta de tratamientos eficaces, la elevada tendencia a la metástasis y también los problemas de detección, lo que evidencia la necesidad de investigación en este campo.

El principal tipo de melanoma es el de extensión superficial (cutáneo), constituyendo el 90% de los casos de melanoma (Ali et al., 2013). Sin embargo, el melanoma de extensión nodular, el lentigo maligno y el lentiginoso acral también son considerados como los tipos de melanoma más frecuentes (Liu y Sheikh, 2014).

1.2. Principales factores de riesgo

Se han identificado varios factores de riesgo que dan predisposición a padecer la enfermedad. Dichos factores podemos clasificarlos como ambientales o genéticos, pero también es relevante la interacción del genotipo con el ambiente al que es expuesto (Conforti et al., 2021).

La pigmentación de la piel supone un factor clave en la susceptibilidad de la piel para el desarrollo de melanoma. Además, el factor de riesgo más común es la piel clara con tendencia a las quemaduras solares. De hecho, la incidencia del melanoma está aumentando en las poblaciones de piel clara, especialmente cuando los individuos se someten a una exposición solar, puesto que una baja pigmentación en la piel se traduce en una mayor sensibilidad a la luz ultravioleta y un mayor riesgo de padecer melanoma (Ali et al., 2013; Conforti et al., 2021).

En cuanto a los factores genéticos, también resulta clave los antecedentes familiares del individuo mientras que uno de los factores genéticos más estudiados son las variantes del gen receptor de melanocortina-1 (MCR), receptor de la superficie celular de los melanocitos que induce la producción de pigmento (Conforti et al., 2021; Soura et al., 2016). Por otro lado, los individuos pelirrojos o que presentan un elevado número de nevus melanocíticos adquiridos, congénitos, múltiples y/o atípicos tienen un mayor riesgo de padecer la enfermedad, siendo este fenotipo otro factor determinado genéticamente (Liu y Sheikh, 2014).

En referencia a la edad, la incidencia de melanoma ha aumentado en todos los grupos etarios, siendo el incremento más acusado en aquellos mayores de 60 años (Bulliard et al., 1994). Por otro lado, se ha asociado la aparición de melanoma con una mayor exposición solar en la infancia y adolescencia, especialmente en aquellos individuos que han pasado por recursivas experiencias de quemaduras solares (Craig et al., 2018; Holman y Armstrong, 1984; White et al., 1994).

Por último, también se ha asociado un mayor riesgo de melanoma con pacientes inmunodeprimidos trasplantados, especialmente en aquellos que ya han pasado por la enfermedad (Conforti et al., 2021; Green y Olsen, 2015; Whiteman et al., 2003).

1.3. Aspectos moleculares del melanoma

En el inicio y el desarrollo de la enfermedad intervienen numerosos cambios moleculares como mutaciones en los genes BRAF y NRAS, hiperactivación de la vía PI3K/AKT, inactivación de p53 o alteraciones en el eje CDK4/CDKN2A (Liu y Sheikh, 2014).

Por otro lado, Howell et al., (2010) demostraron la relevancia de los microRNAs o miRNAs en el proceso patológico del melanoma. Dichos miRNAs tienen una longitud de 22nt y pueden adquirir una gran relevancia como mediadores de la regulación de la expresión génica. Estos se unirían a secuencias complementarias en la región 3'UTR de los ARNm, provocando la consecuente degradación y supresión de la traducción del transcrito objetivo (Ghafouri-Fard et al., 2021; O'Brien et al., 2018).

No obstante, los miRNAs también han sido relacionados con los efectos terapéuticos de agentes anticancerígenos, por ejemplo, se ha visto que ciertas isoflavonas como la genisteína, pueden suprimir la proliferación de células de melanoma mediante la modulación de la expresión de miR-27a y su gen diana ZBTB10 (Sun et al., 2009). Por otro lado, los miRNAs miR-488-3p, miR-195 y miR-211, participan en la regulación de la respuesta al cisplatino, empleado en quimioterapia (Cirilo et al., 2017; Ghafouri-Fard et al., 2021; Li et al., 2017, 2019). Sin embargo, la aplicación terapéutica de miRNAs viene limitada por la especificidad de la diana (S. Liu et al., 2012).

1.4. Detección y tratamientos

Cuando el cáncer se diagnostica en fases tempranas, la extracción quirúrgica del tumor es la opción adecuada para mejorar la supervivencia de los pacientes, sin embargo, el potencial metastásico del melanoma compromete la eficacia de la cirugía para solucionar el problema en las fases más avanzadas de la enfermedad (Erdei y Torres, 2010).

Además, aunque la tasa de mortalidad del melanoma primario es del 11%, los pronósticos no son optimistas si se trata de melanoma metastásico debido a la ineficacia de los tratamientos convencionales (Liu y Sheikh, 2014; Safa et al., 2020). Para este tipo de pacientes, los tratamientos de inmunoterapia como, por ejemplo, aquellos que incluyen la administración de anti-PD1 solo o combinado con CTLA4 (proteína 4 asociada con linfocitos T citotóxicos), han aumentado la supervivencia de estos (Gellrich et al., 2020).

Desgraciadamente, el diagnóstico del melanoma sigue siendo problemático en la actualidad debido a la falta de biomarcadores eficientes que permitan la detección temprana y precisa de esta enfermedad, así como la predicción de la evolución de esta en un paciente una vez detectada.

2. Hipótesis y objetivos

La hipótesis general de este trabajo considera que un enfoque computacional integrador de todos los estudios publicados en melanoma con marcadores de miRNAs, puede contribuir a mejorar la comprensión de los mecanismos moleculares en el melanoma, los procesos de regulación que se producen y generar nuevas estrategias y recursos para su detección temprana y tratamiento.

Por ello, el objetivo general de este trabajo es la detección de los diferentes mecanismos moleculares diferenciales que hay detrás del melanoma, como la expresión diferencial de miRNAs. En ocasiones, sabemos que existen estas diferencias mediante indicadores clínicos y epidemiológicos, pero no sabemos con exactitud a qué se deben. Esta información permitiría ser más precisos en el diagnóstico y en la selección de los tratamientos para cada grupo de pacientes.

Este objetivo se alcanzará mediante el cumplimiento de los siguientes objetivos específicos:

1. Revisión sistemática y selección de estudios de melanoma con datos de microarrays de miRNAs en los repositorios Gene Expression Omnibus (GEO) y ArrayExpress.
2. Análisis individual de cada estudio seleccionado, incluyendo un análisis de expresión diferencial.
3. Metaanálisis de miRNAs de los resultados que permitirá la detección de biomarcadores específicos.

3. Material y Métodos

3.1. Estrategia computacional

Para abordar los diferentes objetivos planteados se realizó una revisión sistemática en las diferentes bases de datos y, particularmente, en GEO y ArrayExpress. A continuación, se realizó una selección de estudios y se descargaron los datos de aquellos que finalmente resultaron seleccionados. Seguidamente, se realizó un análisis exploratorio de cada uno de los estudios y se dio paso a la normalización de datos. Además, se analizaron las muestras de los estudios y se plantearon diferentes grupos de contraste. Finalmente, se realizó un estudio de expresión diferencial para cada uno de ellos y un metaanálisis para el escenario de diagnóstico planteado.

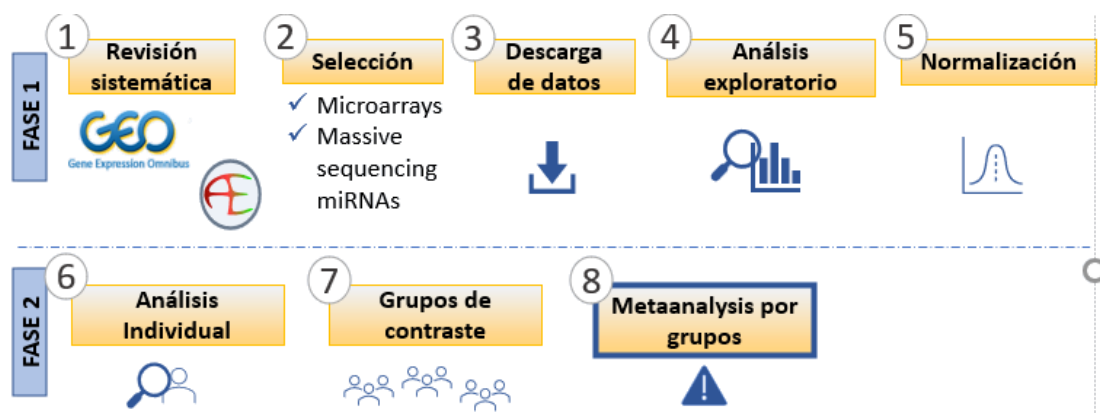


Figura 1. Esquema de las fases de estrategia computacional planteada.

3.2. Revisión sistemática y selección de estudios

La revisión sistemática es el proceso mediante el cual se coteja la evidencia empírica de que una metodología cumple determinados criterios de elegibilidad para hacer frente a preguntas concretas. Su metodología consiste en el establecimiento de objetivos claros, una búsqueda sistemática de estudios que cumplan con los criterios de elegibilidad establecidos, la evaluación de su validez y la síntesis de los resultados obtenidos (Liberati et al., 2009).

En nuestro caso, la revisión sistemática consistió en la realización de una búsqueda exhaustiva de estudios con datos de microarrays de miRNAs en los repositorios de Gene Expression Omnibus (GEO) y ArrayExpress. Las palabras empleadas en los respectivos filtros de búsqueda fueron: melanoma, micrnas, microna, *Homo sapiens* y *expression profiling by array*. Además, también se realizó un filtrado por un número de muestras mayor a 12.

En los estudios obtenidos tras la búsqueda, se llevó a cabo un filtrado atendiendo a los siguientes criterios:

1. Enfocados en melanoma.
2. Estudios de análisis de miRNAs.
3. Muestras de tejido de Homo sapiens (exclusión de líneas celulares).
4. Número de muestras mínimo ($n_{\text{mínimo}}=12$).
5. Muestras sin tratamiento.

Además, se excluyeron aquellos estudios en los que el número de muestras era inferior a 12, aquellos que no estaban centrados exclusivamente en melanoma, los que se centraban en melanoma uveal y los que contenían líneas celulares o muestras que habían recibido algún tipo de tratamiento.

El análisis y presentación de resultados se realizaron de acuerdo con la guía PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) (Page et al., 2021).

3.3. Procesado de datos

Una vez se tuvieron los estudios seleccionados, se descargaron los datos normalizados de cada uno de ellos. A continuación, se analizaron los estudios de forma individual para después poder combinar los resultados. Además, durante el análisis individual se realizó un filtrado de los miRNAs exclusivos de *Homo sapiens* y se eliminaron las sondas utilizadas como controles en el análisis de origen.

Tras el análisis exploratorio individual, se normalizaron los datos de aquellos estudios que no lo estaban y se eliminaron las muestras que presentaban un comportamiento anómalo. De esta forma, se partía de todos los estudios seleccionados con datos normalizados y se evitaba introducir nuevos sesgos y, por tanto, mayor variabilidad en los análisis posteriores.

Todo el procesado de datos se realizó con el lenguaje de programación R (R Core Team, 2021) desde la interfaz gráfica de RStudio. Los paquetes empleados para la descarga, procesado y análisis de los datos fueron los siguientes: *limma* (Ritchie et al., 2015); *ggplot2* (Wickham, 2009); *dplyr* (Wickham, 2021a); *Biobase* (Huber et al., 2015); *factoextra* (Kassambara y Mundt, 2020); *impute* (Hastie y Tibshirani, 2021) y *stringr* (Wickham, 2021b).

3.4. Selección de los grupos de contraste

En vista al tipo de muestras que componían los diferentes estudios, se seleccionaron los distintos grupos de contraste para el escenario de diagnóstico planteado.

Tabla 1. Grupos de contraste para cada escenario.

Escenario	Grupo control	Grupo caso	Estudio
<i>Diagnóstico</i>	Pacientes con nevus benigno	Pacientes con melanoma (metastásico y/o primario)	E-GEOD-18509
			E-GEOD-34460
			E-MTAB-915

Por otro lado, debido a la naturaleza diversa de los estudios, había una gran variabilidad tanto en la metodología como en la nomenclatura empleada en cada uno de ellos. Por ello, también se realizó una normalización de la nomenclatura de los datos clínicos con el fin de facilitar la integración de los datos en el posterior metaanálisis.

Tabla 2. Normalización de la nomenclatura para cada escenario.

Tipo de contraste	Grupo control	Grupo de comparación
<i>Diagnóstico</i>	"Nevus"	"Melanoma"

3.5. Análisis exploratorio individual de los estudios y expresión diferencial

Antes de la realización de cualquier tipo de análisis resulta crucial realizar un examen exploratorio individual de cada uno de los estudios seleccionados, con el fin de tener en cuenta la metodología empleada en cada uno de ellos y facilitar la correcta interpretación de los resultados. Con ello, también se pretende generar y estandarizar los distintos resultados para poder combinarlos posteriormente en el metaanálisis. Además, el análisis exploratorio también permitió observar si las diferentes muestras seguían algún tipo de patrón relacionado con las variables de interés.

De forma complementaria, también se realizó un análisis estadístico descriptivo, que ayudó a identificar datos y comportamientos anómalos en los datos, así como la distribución de los diferentes grupos de interés.

El análisis descriptivo consistió en:

- a. Diagramas de cajas (box-plot): Se representaron los niveles de expresión de cada una de las muestras. Ello permitió observar la presencia o ausencia de anomalías en los datos. En el caso de encontrarlas, estas fueron corregidas.
- b. Clustering de las muestras: Partiendo de los datos normalizados, se realizó un análisis de agrupamiento con el fin de observar los posibles agrupamientos entre los datos. Este análisis también facilitó la selección de los diferentes grupos de contraste.

- c. Análisis por Componentes Principales (PCA): Representación de la proyección de las muestras que facilitó la observación de *outliers* en los datos, así como también posibles relaciones de agrupamiento de los datos.

Por último, se realizó un análisis de expresión diferencial para cada uno de los estudios. Para ello, se realizaron comparaciones entre los diferentes grupos de contraste definidos en cada estudio. El objetivo principal de este análisis era la identificación de los miRNAs diferencialmente expresados para poder establecer posibles diferencias entre el contraste planteado.

3.6. Metaanálisis

El metaanálisis es un tipo de investigación científica que tiene como objetivo integrar de forma objetiva y sistemática los resultados de estudios empíricos sobre una determinada materia, resultando ser una herramienta útil en el campo de las ciencias médicas.

La técnica del metaanálisis consiste en la revisión y agrupación de los resultados, en este caso, de expresión diferencial de distintos estudios sobre un mismo campo de estudio, de forma que, al incrementarse la muestra disponible, los resultados obtenidos sean más robustos a nivel estadístico (Liberati et al., 2009; Normand, 1999).

Además, la combinación de diferentes resultados también permite eliminar el ruido de fondo causado por la plataforma usada, el diseño experimental o incluso otorgar de significado estadístico a parámetros que si se analizasen por separado no lo tendrían. Asimismo, se trata de una técnica muy versátil que hace posible realizarla a diferentes niveles (transcrito, expresión diferencial o funcional) (García-García, 2016).

Para la realización del metaanálisis y el planteamiento del escenario abordado fueron considerados los siguientes aspectos:

1. Diseño del estudio.
2. Criterios de inclusión/exclusión de los estudios.
3. Variables de interés a evaluar.
4. Búsqueda bibliográfica.
5. Selección de los estudios.
6. Evaluación de la calidad de los estudios.
7. Extracción de la información.
8. Análisis estadístico.

Además, para la realización metaanálisis se utilizó el lenguaje de programación R (R Core Team, 2021), empleándose el paquete *metafor* (Viechtbauer, 2010).

4. Resultados y discusión

4.1. Revisión y selección de estudios

Tras la búsqueda sistemática se encontraron 18 estudios procedentes de la base de datos GEO, mientras que 37 estudios resultaron de la búsqueda realizada en ArrayExpress. Del total de los 55 estudios encontrados, se eliminaron los duplicados, resultando un total de 47 estudios. A continuación, se analizaron cuáles se podían desglosar en varios estudios y se incorporaron, resultando un total de 52 estudios. Una vez se tenían identificados el número total de estudios, se comenzó con el proceso de filtrado. En primer lugar, se eliminaron aquellos estudios que no estaban centrados en melanoma, aquellos cuyas muestras eran líneas celulares y aquellos cuyo número de muestras era insuficiente.

Tras el filtrado, se contó con un total de 19 estudios susceptibles de ser elegidos. A continuación, se realizó un nuevo filtrado más exhaustivo y se volvieron a eliminar los estudios que no estaban centrados en melanoma, aquellos cuyas muestras eran líneas celulares y aquellos cuyo número de muestras era insuficiente. Además, debido a que el escenario planteado era de diagnóstico, también se filtraron aquellos que no comparaban tejido de melanoma con tejido de nevus, así como también se descartaron aquellos estudios cuyas muestras habían recibido algún tipo de tratamiento.

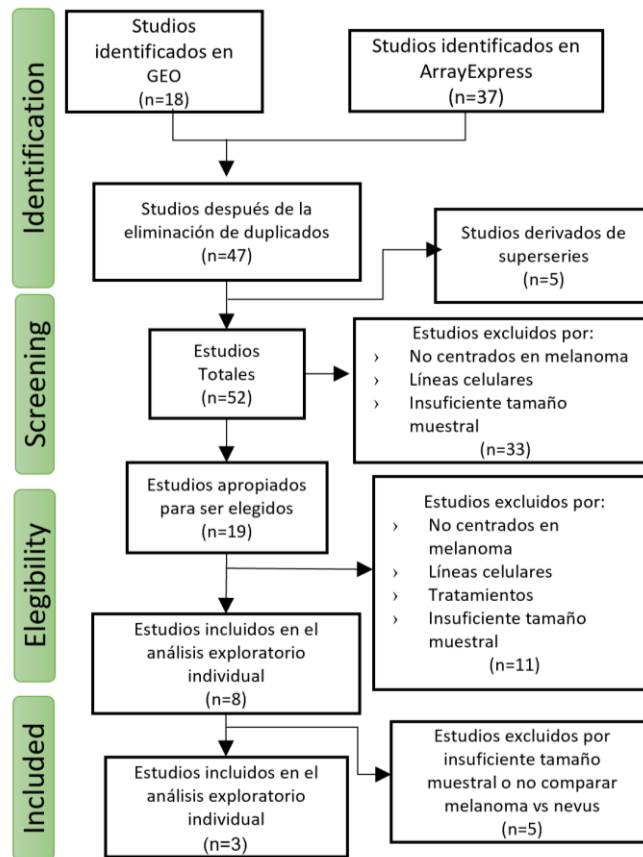


Figura 2. Diagrama PRISMA empleado en la revisión sistemática de estudios.

Tras el proceso de filtrado, los estudios elegidos fueron 3: E-MTAB-915, E-GEOD-18509 y E-GEOD-34460.

4.2. Análisis individual de estudios y expresión diferencial

a. E-MTAB-915

En este estudio seleccionado de la base de datos de ArrayExpress presentaba la siguiente distribución de muestras:

Tabla 3. Distribución de muestras del estudio E-MTAB-915.

	Hombres	Mujeres
Nevus	9	7
Melanoma	0	3

Como podemos ver, no contamos con pacientes masculinos para el tejido de melanoma cutáneo. Por otro lado, el diagrama de cajas no mostró ningún tipo de comportamiento anormal entre las muestras. En lo referente al PCA (Figura 4) y el análisis de clustering, los gráficos señalaron un agrupamiento entre las muestras por tipos de muestra: nevus y melanoma cutáneo

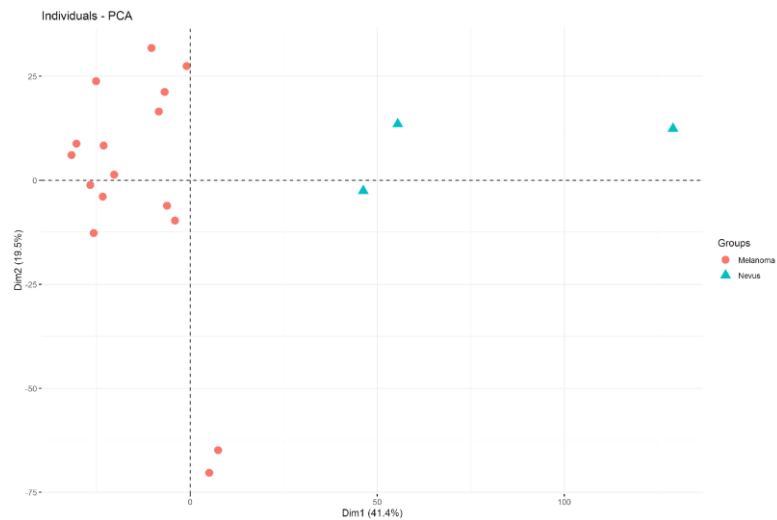


Figura 3. PCA del estudio E-MTAB-915.

Por último, el análisis de expresión diferencial 1546 miRNAs resultaron significativos, estando un total de 648 miRNAs sobreexpresados ($FC > 0$).

b. E-GEOD-18509.

En este estudio, perteneciente a la base de datos de GEO, se contaban con 8 muestras para el tejido de nevus y otras 8 para el tejido de melanoma y no se contaba con la información del sexo de los pacientes.

El diagrama de cajas reveló un comportamiento anormal de los datos, que tuvieron que transformarse con el log2 para subsanarlo.

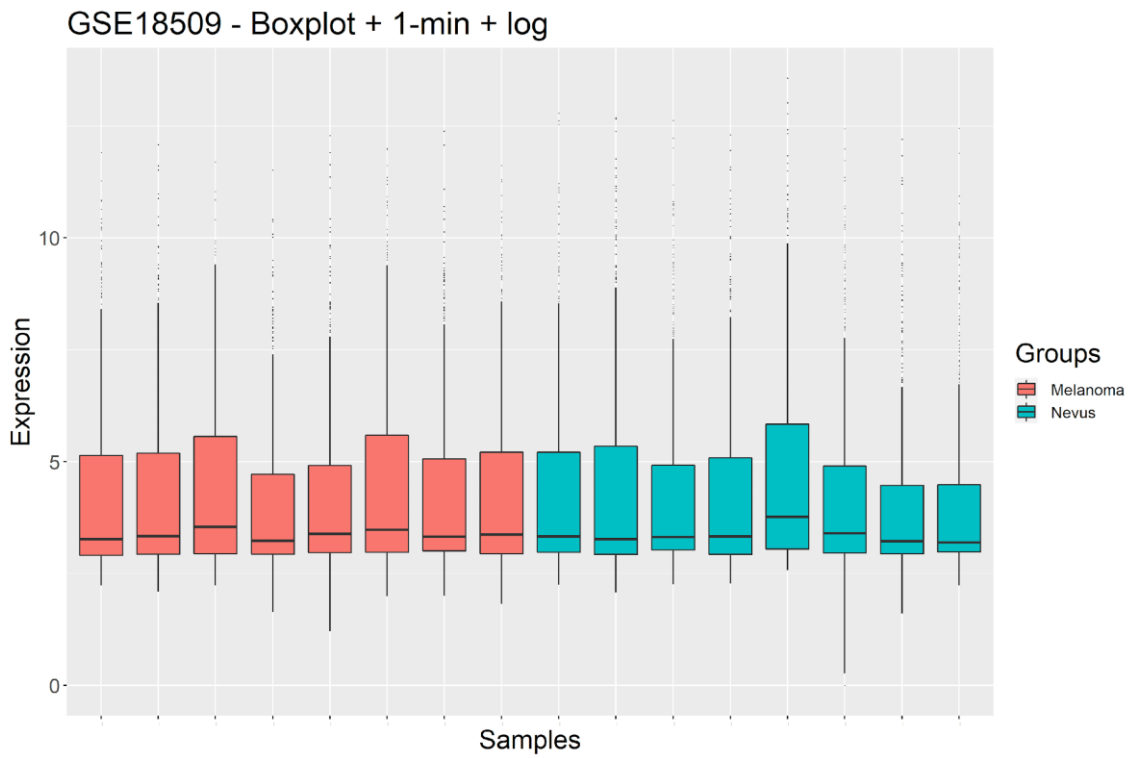


Figura 4. Boxplot después de la normalización de los datos con \log_2 .

Por otro lado, los análisis de *clustering* revelaron también una agrupación por tipo de tejido.

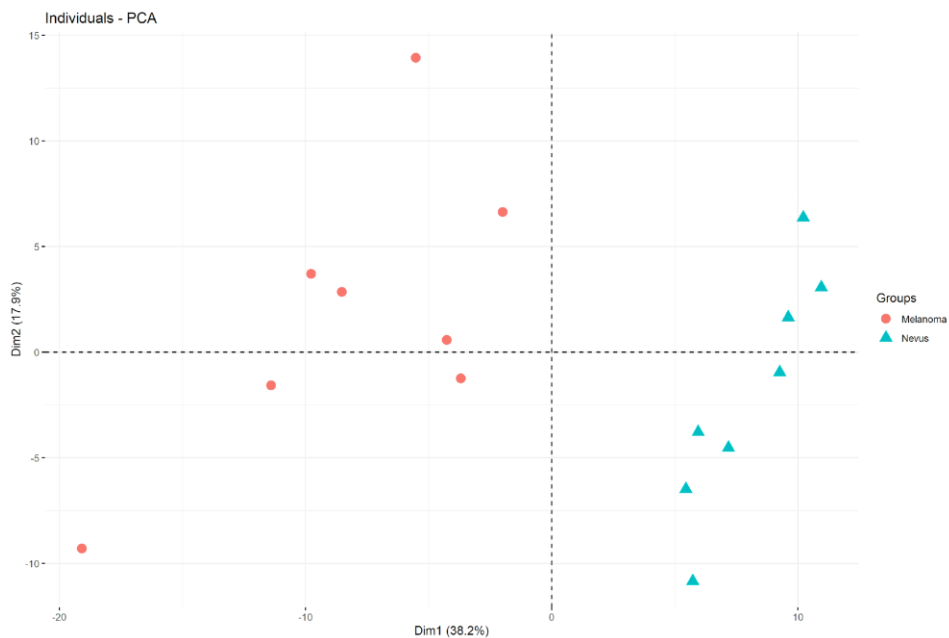


Figura 5. PCA del estudio E-GEOD-18509.

Además, en el análisis de expresión diferencial únicamente 22 resultaron sobreexpresados ($FC > 0$) de los 44 que resultaron significativos.

c. E-GEOD-34460

En este estudio, perteneciente a la base de datos de GEO, podemos encontrar 3 tipos de contrastes.

i. Melanoma primario vs. Nevus

La distribución de muestras para este contraste la encontramos en la Tabla 5.

Tabla 4. Distribución de las muestras del estudio E-GEOD-34460 para el contraste “Melanoma primario vs. Nevus”.

	Hombres	Mujeres
Melanoma	7	2
Nevus	5	3

El diagrama de cajas reveló un comportamiento anómalo de los datos por lo que tuvieron que normalizarse. Por otro lado, tanto el dendrograma como la representación del PCA señalaron un agrupamiento de las muestras según el tipo de tejido.

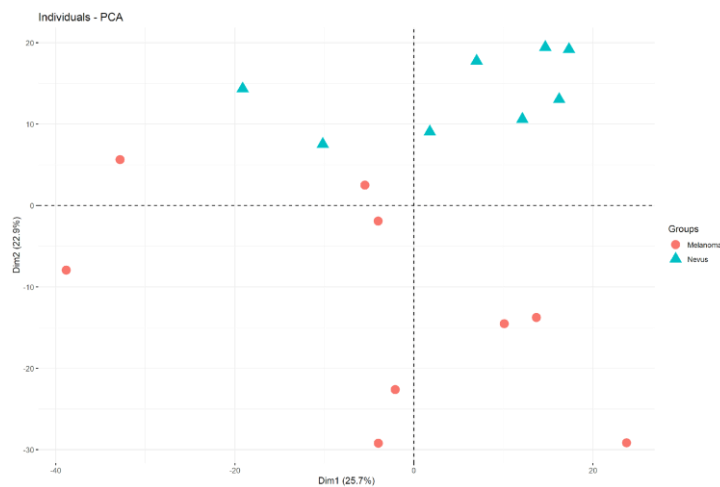


Figura 6. PCA del estudio E-GEOD-34460, contraste “Melanoma” vs. “nevus”, correspondiente al melanoma primario vs. nevus.

Por último, el análisis de expresión diferencial reveló que de los 15 miRNAs significativos, únicamente 6 estaban sobreexpresados (FC>0).

ii. Melanoma metastásico vs. Nevus

La distribución de muestras para este contraste la encontramos en la Tabla 5.

Tabla 5. Distribución de las muestras del estudio E-GEOD-34460 para el contraste “Melanoma metastásico vs. Nevus”.

	Hombres	Mujeres
Melanoma	2	2
Nevus	5	3

El diagrama de cajas también reveló un comportamiento anómalo de los datos y tuvieron que normalizarse. Por otro lado, tanto el dendograma como la representación del PCA señalaron un agrupamiento de las muestras por tipo de tejido.

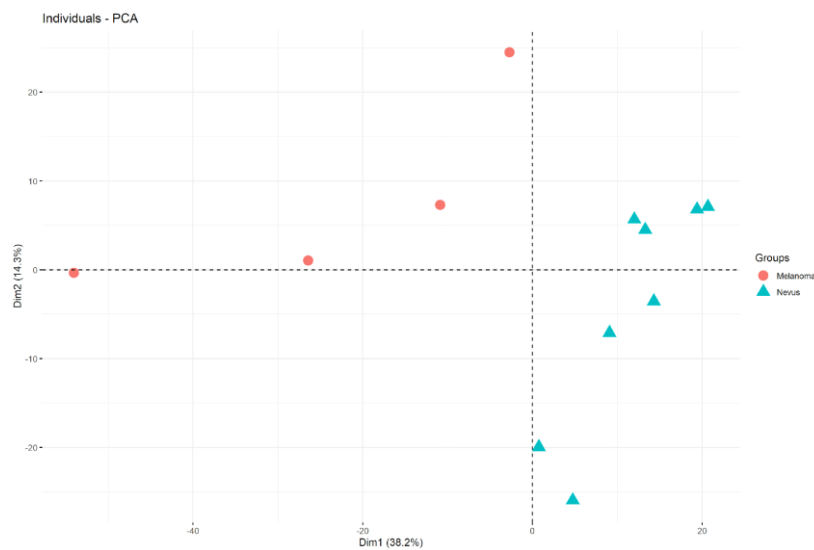


Figura 6. PCA del estudio E-GEOD-34460, contraste “Melanoma” vs. “Nevus”, correspondiente al melanoma metastásico vs. nevus.

Por último, el análisis de expresión diferencial reveló solamente 18 miRNAs sobreexpresados (FC>0) de los 35 que resultaron significativos.

4.3. Metaanálisis de miRNAs

El metaanálisis se realizó bajo el objetivo de identificar miRNAs significativos como marcadores de diagnóstico de la enfermedad. Los grupos de comparación incluidos en este escenario fueron los descritos en la Tabla 6:

Tabla 6. Estudios incluidos en el escenario de diagnóstico.

Estudio	Grupo que se comparan	Contraste
<i>E-GEOD-18509</i>	Melanoma metastásico vs. Nevus benigno	
<i>E-GEOD-34460</i>	Melanoma primario vs. Nevus melanocítico	Melanoma vs. Nevus
	Melanoma metastásico vs. Nevus	
<i>E-MTAB-915</i>	Melanoma cutáneo vs. Nevus melanocítico	

En la Tabla 7 se describen los 84 miRNAs que resultaron significativos tras el metaanálisis para el abordaje de diagnóstico.

Tabla 7. miRNAs significativos del metaanálisis de diagnóstico.

miRNA	logFC	pvalue	p.adjust (fdr)	p.adjust (BY)	miRNA	logFC	pvalue	p.adjust (fdr)	p.adjust (BY)
<i>hsa-let-7a</i>	-1.062	0	0	0	<i>hsa-miR-720</i>	1.327	0	0	0
<i>hsa-let-7c</i>	-0.768	0	0	0.001	<i>hsa-miR-891b</i>	-0.938	0	0	0.003
<i>hsa-let-7f</i>	-0.553	0	0	0	<i>hsa-miR-93</i>	0.844	0	0	0.001
<i>hsa-miR-100</i>	-1.518	0	0	0	<i>hsa-miR-101</i>	-1.378	0	0.001	0.005
<i>hsa-miR-125b</i>	-1.502	0	0	0	<i>hsa-miR-103a</i>	0.397	0	0.001	0.011
<i>hsa-miR-1260</i>	1.073	0	0	0	<i>hsa-miR-106b</i>	1.127	0	0.001	0.007
<i>hsa-miR-1274b_v16.0</i>	1.603	0	0	0.004	<i>hsa-miR-1274a_v16.0</i>	2.352	0	0.001	0.004
<i>hsa-miR-1280</i>	1.05	0	0	0.003	<i>hsa-miR-142-5p</i>	1.364	0	0.001	0.009
<i>hsa-miR-130b</i>	1.336	0	0	0	<i>hsa-miR-378</i>	-0.862	0	0.001	0.005
<i>hsa-miR-141</i>	-2.913	0	0	0	<i>hsa-miR-155</i>	2.661	0	0.002	0.016
<i>hsa-miR-142-3p</i>	1.842	0	0	0	<i>hsa-miR-3141</i>	2.436	0	0.002	0.017
<i>hsa-miR-149</i>	-3.554	0	0	0.001	<i>hsa-miR-3195</i>	1.026	0	0.002	0.015
<i>hsa-miR-18a</i>	1.842	0	0	0	<i>hsa-miR-378*</i>	-3.429	0	0.002	0.012
<i>hsa-miR-193b</i>	-1.399	0	0	0.003	<i>hsa-miR-4281</i>	1.7	0	0.002	0.014
<i>hsa-miR-1973</i>	3.431	0	0	0	<i>hsa-miR-508-5p</i>	-3.052	0	0.002	0.016
<i>hsa-miR-200b</i>	-3.025	0	0	0	<i>hsa-miR-30c</i>	-0.468	0	0.003	0.023
<i>hsa-miR-200c</i>	-4.587	0	0	0	<i>hsa-miR-3610</i>	1.288	0	0.005	0.036
<i>hsa-miR-203</i>	-4.07	0	0	0	<i>hsa-miR-196a</i>	0.67	0	0.007	0.053
<i>hsa-miR-204</i>	-4.126	0	0	0	<i>hsa-miR-146b-5p</i>	1.466	0	0.008	0.058
<i>hsa-miR-205</i>	-5.129	0	0	0	<i>hsa-miR-195</i>	-0.911	0.001	0.01	0.08
<i>hsa-miR-21</i>	2.364	0	0	0	<i>hsa-miR-296-5p</i>	0.813	0.001	0.01	0.08
<i>hsa-miR-21*</i>	6.761	0	0	0	<i>hsa-miR-126</i>	0.664	0.001	0.013	0.099
<i>hsa-miR-22</i>	1.163	0	0	0	<i>hsa-miR-3137</i>	1.066	0.001	0.016	0.124
<i>hsa-miR-224*</i>	-3.624	0	0	0	<i>hsa-miR-99a</i>	-1.138	0.001	0.017	0.127
<i>hsa-miR-23a</i>	-0.734	0	0	0	<i>hsa-miR-671-5p</i>	2.997	0.001	0.02	0.157
<i>hsa-miR-23b</i>	-2.122	0	0	0	<i>hsa-miR-197</i>	-0.389	0.001	0.021	0.165
<i>hsa-miR-23b*</i>	-3.477	0	0	0	<i>hsa-miR-513a-5p</i>	-1.452	0.001	0.022	0.166
<i>hsa-miR-24-1*</i>	-3.765	0	0	0	<i>hsa-miR-200b*</i>	-0.807	0.002	0.028	0.213
<i>hsa-miR-26a</i>	-1.071	0	0	0	<i>hsa-miR-873</i>	-1.78	0.002	0.028	0.213
<i>hsa-miR-26b</i>	-0.849	0	0	0	<i>hsa-miR-3138</i>	1.53	0.002	0.031	0.235
<i>hsa-miR-27b</i>	-1.497	0	0	0	<i>hsa-miR-4286</i>	2.093	0.002	0.031	0.235

miRNA	logFC	pvalue	p.adjust (fdr)	p.adjust (BY)	miRNA	logFC	pvalue	p.adjust (fdr)	p.adjust (BY)
<i>hsa-miR-29c*</i>	-2.907	0	0	0.003	<i>hsa-miR-3663-3p</i>	1.007	0.002	0.032	0.244
<i>hsa-miR-301a</i>	3.927	0	0	0.003	<i>hsa-miR-107</i>	0.508	0.002	0.033	0.25
<i>hsa-miR-3648</i>	3.345	0	0	0	<i>hsa-miR-29b</i>	0.79	0.002	0.033	0.25
<i>hsa-miR-365</i>	-0.645	0	0	0.003	<i>hsa-miR-1183</i>	1.477	0.002	0.034	0.264
<i>hsa-miR-3665</i>	0.843	0	0	0.003	<i>hsa-miR-221*</i>	-2.3	0.002	0.034	0.259
<i>hsa-miR-3911</i>	2.12	0	0	0.003	<i>hsa-let-7d</i>	-0.493	0.002	0.036	0.275
<i>hsa-miR-4284</i>	0.597	0	0	0	<i>hsa-miR-132</i>	1.579	0.002	0.036	0.275
<i>hsa-miR-455-3p</i>	-1.984	0	0	0	<i>hsa-miR-3198</i>	1.037	0.002	0.036	0.28
<i>hsa-miR-483-5p</i>	2.776	0	0	0	<i>hsa-miR-940</i>	0.52	0.003	0.04	0.306
<i>hsa-miR-574-3p</i>	-2.295	0	0	0	<i>hsa-miR-185</i>	0.851	0.003	0.045	0.343
<i>hsa-miR-664</i>	-4.127	0	0	0	<i>hsa-miR-363</i>	2.797	0.003	0.049	0.376

**Tabla 11 (continuación).*

5. Discusión

El melanoma, es el único tumor en el que una lesión de poco más de 1 milímetro puede prestar alto riesgo de metástasis. Estudios de la enfermedad han identificado algunos rasgos fenotípicos como factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad como es la piel clara, presentar un alto número de nevi, ser paciente trasplantado o propenso a las quemaduras solares (CNIO, 2022).

Sin embargo, a nivel molecular, aunque se han identificado diversas alteraciones genéticas y epigenéticas, así como también procesos de evasión inmunológica, no se ha aprobado ningún marcador molecular como indicador de pronóstico de la enfermedad (CNIO, 2022). Es por ello por lo que, unido con la evidente necesidad de una detección temprana de la enfermedad, el objetivo principal de este trabajo es objetivo general de este trabajo es la detección y comprensión de los diferentes mecanismos moleculares diferenciales que hay detrás del melanoma.

Para ello se realizó una revisión sistemática de estudios de acuerdo con la guía PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) (Page et al., 2021). Además, la revisión sistemática tiene por objeto recopilar pruebas que se ajusten a criterios de elegibilidad previamente especificados para responder a una pregunta de investigación específica, en este caso, nuestro objetivo. Con este método se logra, además, minimizar el sesgo mediante el uso de métodos explícitos y sistemáticos documentados de antemano con un protocolo (Higgins y Thomas, 2021). Tras la revisión sistemática también se realizó un análisis exploratorio de los datos que permitió identificar la naturaleza de las muestras y las particularidades metodológicas de cada uno de los estudios. El método empleado para la integración de los datos de los estudios incluidos en cada uno de los escenarios planteados fue

el metaanálisis. Este método ampliamente utilizado, permitió aumentar el poder estadístico dado que se incrementó en número de muestras y, en consecuencia, también se mejoró la precisión en la identificación (Higgins y Thomas, 2021; Normand, 1999), lográndose los objetivos planteados en el trabajo.

Por otro lado, cabe citar que en el desarrollo de la enfermedad algunos estudios han establecido diferencias entre sexos, las cuales estarían debidas más a diferencias biológicas que conductuales como, por ejemplo, el papel que juegan las hormonas esteroideas sexuales en la inmunomodulación (Schwartz et al., 2019). Sin embargo, las mujeres siguen estando infrarrepresentadas en la investigación biomédica y, a pesar de que estas diferencias son claves para la identificación de biomarcadores, en el mejor de los casos, solo se incorpora la variable del sexo como un dato más del paciente y no con el fin de establecer como objetivo hallar diferencias entre hombres y mujeres ((Kim et al., 2010). Es por ello, que en nuestra selección de estudios apenas hemos encontrado trabajos que incorporasen esta variable en sus datos, por lo que, a la hora de clasificar las muestras en el análisis exploratorio, no hemos podido considerarla.

No obstante, debido a la diversidad en la naturaleza de tejidos encontrada entre los estudios que finalmente resultaron candidatos a ser seleccionados, se decidió descartar aquellos que no comparaban melanoma con nevus puesto que el objetivo del estudio encontrar las diferencias de expresión de miRNAs entre un tejido sano y otro con melanoma, estableciendo futuros identificadores de un diagnóstico temprano de la enfermedad.

Para ello, el método de comparación en el análisis de expresión diferencial y metaanálisis fue el de "Caso" - "Control". En este escenario, el grupo correspondiente al tejido de melanoma se asignó como el grupo "Caso", mientras que el grupo correspondiente al tejido de nevus se trató como el grupo "Control". Tras el análisis exploratorio individual, se incluyó en el metaanálisis la expresión diferencial individual de los estudios correspondientes y se tuvo un total de 84 miRNAs significativos.

El resultado de este estudio abre la puerta a la realización de un enriquecimiento funcional en el que podamos caracterizar mejor cada uno de los miRNAs resultantes, pudiendo mejorar el diagnóstico temprano de este tipo de cáncer de piel.

6. Conclusiones

En este trabajo se ha demostrado que el metaanálisis puede ser una herramienta robusta para la evaluación e integración de datos procedentes de distintos estudios de un mismo campo, en nuestro caso, de una revisión sistemática de estudios de miRNAs de melanoma.

Además, la estrategia planteada en este trabajo permitió detectar la expresión diferencial de miRNAs en un escenario de detección de la enfermedad. No obstante, este estudio también pone de manifiesto la necesidad concienciar a la comunidad científica de la importancia de incorporar la variable de sexo en los estudios biomédicos de melanoma, así como también la estandarización del registro de datos en ensayos clínicos.

Conjuntamente, este estudio abre la puerta a nuevas investigaciones que permitan realizar una caracterización funcional de los miRNAs significativos hallados, permitiendo una nueva perspectiva necesaria en medicina personalizada y precisión en estudios biomédicos en el campo de la investigación de melanoma.

7. Referencias

- Kassambara, A., & Mundt, F. (2020). *Package "factoextra" Type Package Title Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses*. <https://github.com/kassambara/factoextra/issues>
- Ali, Z., Yousaf, N., & Larkin, J. (2013). Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *EJC Supplements*, 11(2), 81. <https://doi.org/10.1016/J.EJCSUP.2013.07.012>
- Bulliard, J. L., Cox, B., & Elwood, J. M. (1994). Latitude gradients in melanoma incidence and mortality in the non-Maori population of New Zealand. *Cancer Causes & Control : CCC*, 5(3), 234–240. <https://doi.org/10.1007/BF01830242>
- Cirilo, P. D. R., de Sousa Andrade, L. N., Corrêa, B. R. S., Qiao, M., Furuya, T. K., Chammas, R., & Penalva, L. O. F. (2017). MicroRNA-195 acts as an anti-proliferative miRNA in human melanoma cells by targeting Prohibitin 1. *BMC Cancer*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12885-017-3721-7/FIGURES/5>
- CNIO. (2022). *Grupo de Melanoma - CNIO*. <https://www.cnio.es/investigacion-e-innovacion/programas-cientificos/programa-de-oncologia-molecular/grupo-de-melanoma/>
- Conforti, C., Zalaudek, I., Kittler, H., Papageorgiou, C., Apalla, Z., Manoli, S.-M., Lallas, K., Vakirlis, E., Lallas, A., de Falco, V., Napolitano, S., Pio Guerrera, L., Troiani, T., Quaglino, P., Fava, P., Tonella, L., Rubatto, M., Ribero, S., Teresa Fierro, M., ... Teresa Fierro Guest Editors Peter Soyer, M. H. (2021). Epidemiology and Risk Factors of Melanoma: A Review. *Dermatology Practical & Conceptual*, 2021161S-2021161S. <https://doi.org/10.5826/DPC.11S1A161S>
- Craig, S., Earnshaw, C. H., & Virós, A. (2018). Ultraviolet light and melanoma. *The Journal of Pathology*, 244(5), 578–585. <https://doi.org/10.1002/PATH.5039>
- Erdei, E., & Torres, S. M. (2010). A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 10(11), 1811. <https://doi.org/10.1586/ERA.10.170>
- García-García, F. (2016). *Methods of functional enrichment analysis in genomic studies*.
- Gellrich, F. F., Schmitz, M., Beissert, S., & Meier, F. (2020). Anti-PD-1 and Novel Combinations in the Treatment of Melanoma—An Update. *Journal of Clinical Medicine 2020, Vol. 9, Page 223*, 9(1), 223. <https://doi.org/10.3390/JCM9010223>
- Ghafouri-Fard, S., Gholipour, M., & Taheri, M. (2021). MicroRNA Signature in Melanoma: Biomarkers and Therapeutic Targets. *Frontiers in Oncology*, 11, 1304. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.608987/BIBTEX>

- Green, A. C., & Olsen, C. M. (2015). Increased risk of melanoma in organ transplant recipients: systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Acta Dermato-Venereologica*, 95(8), 923–927. <https://doi.org/10.2340/00015555-2148>
- Hastie, T., & Tibshirani, R. (2021). *impute: impute: Imputation for microarray data. R package version 1.68.0*. <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/impute.html>
- Higgins, J., & Thomas, J. (2021). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions | Cochrane Training*. <https://training.cochrane.org/handbook/current>
- Holman, C. D. arcy J., & Armstrong, B. K. (1984). Cutaneous malignant melanoma and indicators of total accumulated exposure to the sun: An analysis separating histogenetic types. *Journal of the National Cancer Institute*, 73(1), 75–82. <https://doi.org/10.1093/JNCI/73.1.75>
- Howell, P. M., Li, X., Riker, A. I., & Xi, Y. (2010). MicroRNA in Melanoma. *The Ochsner Journal*, 10(2), 83. [/pmc/articles/PMC3096202/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2010/02/83/pmc/articles/PMC3096202/)
- Huber, W., Carey, V. J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B. S., Bravo, H. C., Davis, S., Gatto, L., Girke, T., Gottardo, R., Hahne, F., Hansen, K. D., Irizarry, R. A., Lawrence, M., Love, M. I., MaDonald, J., Obenchain, V., Oleš, A. K., ... Morgan, M. (2015). Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nature Methods* 2015 12:2, 12(2), 115–121. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3252>
- Kim, A. M., Tinggen, C. M., & Woodruff, T. K. (2010). Sex bias in trials and treatment must end. *Nature*, 465(7299), 688–689. <https://doi.org/10.1038/465688A>
- Li, N., Liu, Y., Pang, H., Lee, D., Zhou, Y., & Xiao, Z. (2019). Methylation-Mediated Silencing of MicroRNA-211 Decreases the Sensitivity of Melanoma Cells to Cisplatin. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 25, 1590. <https://doi.org/10.12659/MSM.911862>
- Li, N., Ma, Y., Ma, L., Guan, Y., Ma, L., & Yang, D. (2017). MicroRNA-488-3p sensitizes malignant melanoma cells to cisplatin by targeting PRKDC. *Cell Biology International*, 41(6), 622–629. <https://doi.org/10.1002/CBIN.10765>
- Liberati, A., Altman, D. G., Tetzlaff, J., Mulrow, C., Gøtzsche, P. C., Ioannidis, J. P. A., Clarke, M., Devereaux, P. J., Kleijnen, J., & Moher, D. (2009). The PRISMA Statement for Reporting Systematic Reviews and Meta-Analyses of Studies That Evaluate Health Care Interventions: Explanation and Elaboration. *PLOS Medicine*, 6(7), e1000100. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.1000100>

- Linos, E., Swetter, S. M., Cockburn, M. G., Colditz, G. A., & Clarke, C. A. (2009). Increasing burden of melanoma in the United States. *The Journal of Investigative Dermatology*, *129*(7), 1666. <https://doi.org/10.1038/JID.2008.423>
- Liu, S., Tetzlaff, M. T., Cui, R., & Xu, X. (2012). miR-200c inhibits melanoma progression and drug resistance through down-regulation of BMI-1. *The American Journal of Pathology*, *181*(5), 1823–1835. <https://doi.org/10.1016/J.AJP.2012.07.009>
- Liu, Y., & Sheikh, M. S. (2014). Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. *Molecular and Cellular Pharmacology*, *6*(3), 228. <https://doi.org/10.4255/mcpharmacol.14.03>
- Noone, A., Howlader, N., Krapcho, M., Miller, D., Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, & Cronin KA. (2018). *Cancer Statistics Review, 1975-2015 - SEER Statistics*. https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2015/
- Normand, S.-L. T. (1999). Meta-analysis: formulating, evaluating, combining, and reporting. *Statistics in Medicine*, *18*(3), 321–359. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0258\(19990215\)18:3<321::AID-SIM28>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0258(19990215)18:3<321::AID-SIM28>3.0.CO;2-P)
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology*, *9*(AUG), 402. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00402/BIBTEX>
- Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Akl, E. A., Brennan, S. E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J. M., Hróbjartsson, A., Lalu, M. M., Li, T., Loder, E. W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., ... Moher, D. (2021). The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *The BMJ*, *372*. <https://doi.org/10.1136/BMJ.N71>
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, *43*(7), e47–e47. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV007>
- Safa, A., Gholipour, M., Dinger, M. E., Taheri, M., & Ghafouri-Fard, S. (2020). The critical roles of lncRNAs in the pathogenesis of melanoma. *Experimental and Molecular Pathology*, *117*. <https://doi.org/10.1016/J.YEXMP.2020.104558>
- Schwartz, M. R., Luo, L., & Berwick, M. (2019). Sex Differences in Melanoma. *Current Epidemiology Reports* *2019 6:2*, *6*(2), 112–118. <https://doi.org/10.1007/S40471-019-00192-7>

- Soura, E., Eliades, P. J., Shannon, K., Stratigos, A. J., & Tsao, H. (2016). Hereditary melanoma: Update on syndromes and management Genetics of familial atypical multiple mole melanoma syndrome. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 74(3), 411–420. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.08.037>
- Sun, Q., Cong, R., Yan, H., Gu, H., Zeng, Y., Liu, N., Chen, J., & Wang, B. (2009). Genistein inhibits growth of human uveal melanoma cells and affects microRNA-27a and target gene expression. *Oncology Reports*, 22(3), 563–567. https://doi.org/10.3892/OR_00000472
- Viechtbauer, W. (2010). Conducting Meta-Analyses in R with the metafor Package. *Journal of Statistical Software*, 36(3), 1–48. <https://doi.org/10.18637/JSS.V036.I03>
- White, E., Kirkpatrick, C. S., & Lee, J. A. H. (1994). Case-control study of malignant melanoma in Washington State. I. Constitutional factors and sun exposure. *American Journal of Epidemiology*, 139(9), 857–868. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.AJE.A117092>
- Whiteman, D. C., Watt, P., Purdie, D. M., Hughes, M. C., Hayward, N. K., & Green, A. C. (2003). Melanocytic Nevi, Solar Keratoses, and Divergent Pathways to Cutaneous Melanoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 95(11), 806–812. <https://doi.org/10.1093/JNCI/95.11.806>
- Wickham, H. (2009). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. In *Media* (Vol. 35, Issue July). <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-98141-3>
- Wickham, H. (2021a). *Package ‘dplyr.’* <https://doi.org/https://dplyr.tidyverse.org>
- Wickham, H. (2021b). *stringr: Simple, Consistent Wrappers for Common String Operations.* .