

Universidade Federal de Pelotas
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**MicroRNAs expressos durante a cicatrização da pele e vias de sinalização associadas:
uma revisão sistemática e análise bioinformática**

Morgana Lüdtke Azevedo

Pelotas, 2021

Morgana Lüdtke Azevedo

**MicroRNAs expressos durante a cicatrização da pele e vias de sinalização associadas:
uma revisão sistemática e análise bioinformática**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Bioquímica e Bioprospecção).

Orientador: Prof. Dr. Rafael Guerra Lund
Coorientadora: Prof. Dra. Fernanda Nedel

Pelotas, 2021

Morgana Lüdtke Azevedo

**MicroRNAs expressos durante a cicatrização da pele e vias de sinalização associadas:
uma revisão sistemática e análise bioinformática**

Data da Defesa: 27/09/2021

Banca examinadora:



.....
Prof. Dr. Rafael Guerra Lund (Orientador)

Doutor em Odontologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel)



.....
Prof. Dr. Carlos Henrique Viesi do Nascimento Filho

Doutor em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)



.....
Prof. Dra. Juliana Silva Ribeiro

Doutora em Odontologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Morgana Lüdtke Azevedo

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A111m Azevedo, Morgana Lüdtke

MicroRNAs expressos durante a cicatrização da pele e vias de sinalização associadas: uma revisão sistemática e análise bioinformática / Morgana Lüdtke Azevedo ; Rafael Guerra Lund, orientador ; Fernanda Nedel, coorientadora.

— Pelotas, 2021.

95 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. MicroRNA. 2. Cicatrização. 3. Vias de sinalização. 4. Revisão sistemática. 5. Análise bioinformática. I. Lund, Rafael Guerra, orient. II. Nedel, Fernanda,

Dedico este trabalho aos meus pais
Tatiani Lüdtkke e Glem Azevedo.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus pela realização de mais um sonho, e por ter me guiado e me acompanhado durante este ciclo, mesmo nos momentos mais desafiadores. E para que eu sempre lembre que nunca estive sozinha, e nem estarei.

Agradeço aos meus pais por me darem a oportunidade de poder estudar, pela educação que recebi e por toda dedicação que sempre tiveram comigo, e ainda têm. Eu não acho que sou capaz de colocar em palavras a enorme gratidão que eu sinto, eu apenas sei que vou lembrar para sempre de cada palavra de apoio de cada um de vocês. Nos momentos mais difíceis em que a vontade de desistir parecia o caminho mais fácil, eu pensava em vocês! O sonho, agora realizado, da pós-graduação é totalmente dedicado a vocês. Obrigada pela vida, pelo amor e pela dedicação comigo! Agradecimentos especiais a minha mãe, o meu alicerce, o centro da minha vida! Sei que as minhas conquistas sempre serão as tuas, por isto e por muito mais: esta é tua. Tem muito de ti nisto, e tem muito de ti em mim. Obrigada por não saíres do meu lado!

Agradeço ao Martin, meu namorado, mas antes, o meu melhor amigo. E o mais compreensível deles! Obrigada por sempre entender minha ausência, principalmente na reta final, nos vários momentos em que eu tinha que estudar. Obrigada por sempre me lembrar que eu seria capaz de chegar até aqui e ainda ir além. O teu apoio foi essencial para que eu realizasse mais um sonho, e sempre será. Muito obrigada!

Agradeço à Roberta Giorgi, minha parceira e minha coorientadora de coração! Eu já falei várias vezes, mas repito: eu não tenho palavras pra te agradecer. A tua dedicação, didática, paciência e, sobretudo, amor no que faz, é algo que pouco se vê hoje em dia, e foi um dos fatores fundamentais para a realização deste trabalho. Saiba que és uma fonte de inspiração profissional para mim. Obrigada por tudo!

Agradeço ao professor Rafael Lund que me acolheu desde o início desta trajetória e sempre acreditou em mim, inclusive nos momentos em que nem eu mesma o fazia. Obrigada pela oportunidade e por todos ensinamentos! E mil vezes obrigada por ser o melhor e mais compreensível orientador que eu poderia ter, os teus ensinamentos ultrapassaram à minha vida acadêmica. Agradeço às professoras Fernanda Nedel e Patrícia Nascente que também fizeram parte da minha formação como mestra. Foi uma honra e de muito importância para mim, como mulher, ter figuras femininas tão qualificadas durante esta trajetória, duas cientistas imensamente competentes das quais me serviram de inspiração. Obrigada por confiarem em mim durante esta trajetória!

Agradeço à Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção por me permitir um ensino de qualidade. Agradeço à banca extremamente qualificada pelo aceite e por todas suas considerações.

Agradeço aos meus familiares e amigos que também estiveram ao meu lado nestes dois anos me dando o apoio necessário e a todos que sempre torceram por mim!

Muito obrigada!

“First, think. Second, believe. Third, dream. And finally, dare.”

- Walt Disney

Resumo

AZEVEDO, Morgana Lüdtkke. **MicroRNAs expressos durante a cicatrização da pele e vias de sinalização associadas: uma revisão sistemática e análise bioinformática.** 2021. 95f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não-codificante constituídos por aproximadamente 22 nucleotídeos, sendo responsáveis, principalmente, pela regulação da expressão gênica a nível pós-transcricional. Os miRNAs podem estar relacionadas a diversos processos biológicos do organismo, como a cicatrização da pele. A cicatrização é um processo biológico complexo, constituído por quatro fases: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. Paralelo a isso, consequências relacionadas a feridas crônicas ou quaisquer feridas que não apresentam uma cicatrização eficiente, têm sido cada vez mais relatadas, principalmente na população mais longeva. Ademais, já são consideradas um importante problema de saúde pública. À vista disso, melhor compreender os miRNAs e as vias de sinalização associadas à cicatrização, pode contornar a problemática relacionada às feridas crônicas, podendo ser aplicada em estudos que visam o desenvolvimento de novas terapias. Sendo assim, devido à necessidade de melhor compreender o papel dos miRNAs envolvidos na cicatrização da pele, o objetivo deste trabalho foi revisar sistematicamente a literatura disponível a fim de identificar os miRNAs e suas respectivas vias de sinalização associados à cicatrização. Para isso, foi realizada uma pesquisa eletrônica nas seguintes bases de dados: National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed), Science Direct, Scifinder, Scopus e Web of Science, utilizando os descritores: “(microRNA [MeSH])” and “(skin [MeSH])” and “(wound healing [MeSH])”. Foram encontrados 3.227 artigos em potencial que, posteriormente, foram exportados para o gerenciador de referências Zotero. Em seguida, dois revisores independentes e previamente calibrados, concluíram a etapa de exclusão das referências duplicadas. Após a aplicação dos critérios de elegibilidade nos artigos, foram selecionados aqueles relacionados à análise de expressão de miRNA na cicatrização em animais *in vivo*. Por fim, foram realizadas as análises de bioinformática utilizando o software DIANA Tools, mirPath v.3. Logo, os dados obtidos foram analisados e interpretados. A análise de bioinformática revelou que no dia 1, entre os miRNAs com aumento em sua expressão, havia 13 vias de sinalização de união, sendo oito estatisticamente significativas. Já entre o miRNAs com diminuição em sua expressão, ainda no dia 1, foram encontradas 17 vias de união, sendo 12 estatisticamente significativas. Enquanto no dia 5, entre o miRNAs com expressão aumentada, foram encontradas 16 vias de união, 12 das quais foram estatisticamente significativas. Por fim, entre os miRNAs com expressão diminuída, foram encontradas 15 vias de união, 11 foram estatisticamente significativas. Através da presente revisão sistemática, foi possível desenvolver um panorama dos miRNAs e melhor compreender a maneira de como podem estar alterados na cicatrização de feridas. Ainda que tenha sido observada considerável heterogeneidade entre os estudos selecionados, é possível identificar quais miRNAs e as vias de sinalização envolvidas no processo de cicatrização. Destarte, os resultados aqui obtidos, além de propiciar uma melhor compreensão sobre os miRNAs e seu mecanismo de ação – focalizando no processo de cicatrização da pele –, futuramente, poderão ser aplicados em possíveis novas abordagens terapêuticas.

Palavras-chave: microRNA; cicatrização; vias de sinalização; revisão sistemática; análise bioinformática.

Abstract

AZEVEDO, Morgana Lüdtkke. **MicroRNAs expressed during wound healing and associated signaling pathways: a systematic review and bioinformatics analysis.** 2021. 95f. Dissertation (Master in Biochemistry and Bioprospecting) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules made up of approximately 22 nucleotides, and are, mainly, responsible for regulating gene expression at the post-transcriptional level. MiRNAs can be related to several biological processes of the organism, such as skin healing. Healing is a complex biological process, consisting of four phases: hemostasis, inflammation, proliferation, and remodeling. Parallel to this, consequences related to chronic wounds or any wounds that do not present efficient healing have been increasingly reported, especially in the longer-lived population. Furthermore, they are already considered an important public health problem. In view of this, a better understanding of miRNAs and the signaling pathways associated with wound healing can attenuate the problem related to chronic wounds and can be applied in studies aimed at the development of new therapies. Therefore, due to the need to better understand the role of miRNAs involved in skin wound healing, the aim of this study was to systematically review the available literature in order to identify miRNAs and their respective signaling pathways associated with skin wound healing. For this, an electronic search was carried out in the following databases: National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed), Science Direct, Scifinder, Scopus and Web of Science, using the descriptors: “(microRNA [MeSH])” and “(skin [MeSH])” and “(wound healing [MeSH])”. A total of 3,227 potential articles were found and were later exported to the Zotero reference manager. Then, two independent and previously calibrated reviewers completed the step of excluding duplicate references. After applying the eligibility criteria in the articles, those related to the analysis of miRNA expression in healing in animals in vivo were selected. Finally, bioinformatics analyzes were performed using DIANA Tools software, mirPath v.3. Soon, the data obtained were analyzed and interpreted. Bioinformatics analysis revealed that on day 1, among the miRNAs with increased expression, there were 13 binding signaling pathways, eight of which were statistically significant. Among the miRNAs with decreased expression, even on day 1, 17 union pathways were found, 12 of which were statistically significant. While on day 5, among miRNAs with increased expression, 16 binding pathways were found, 12 of which were statistically significant. Finally, among the miRNAs with decreased expression, 15 binding pathways were found, 11 of which were statistically significant. Through this systematic review, it was possible to develop an overview of miRNAs and better understand how they can be altered in wound healing. Although considerable heterogeneity was observed among the selected studies, it is possible to identify which miRNAs and signaling pathways are involved in the healing process. Thus, the results obtained, in addition to providing a better understanding of miRNAs and their mechanism of action – focusing on the skin wound healing process –, hereafter, they may be applied in possible new therapeutic approaches.

Keywords: microRNA; wound healing; signaling pathways; systematic review; bioinformatics analysis.

Lista de Figuras

Figura 1 – Ilustração da biogênese do microRNAs.	17
Figura 2 – Ilustração da biogênese do microRNAs.	17
Figura 3 – Gráfico do número de miRNAs indexados no banco de dados de 2003 a 2013.	27
Figura 4 – Gráfico das principais espécies de acordo com p número de artigos associados a microRNAs.	28

Manuscrito “MicroRNAs expressed during wound healing and their associated pathways: a systematic review and bioinformatic analysis”

Figure 1 – Flow diagram of study selection.	71
Figure 2 – Correlation between publication countries and years of selected articles.	71
Figure 3 – Heatmap of KEGG pathways referring to increased or decreased expression of miRNAs at different times of analysis.	72
Figure 4 –Risk of bias of each study in the domains: wound healing assay, miRNA analyze and presence of a control group.	73

Lista de Tabelas

Manuscrito “MicroRNAs expressed during wound healing and their associated pathways: a systematic review and bioinformatic analysis”

Table 1 – Correlation of the main methodological approaches found in the selected articles.	41
Table 2 – Correlation of results regarding the expression pattern of miRNAs at different times of analysis.....	43
Table 3 – Statistically significant union pathways referring to the miRNAs with increased expression on the day 1.....	54
Table 4 – Statistically significant union pathways referring to the miRNAs with decreased expression on the day 1.....	56
Table 5 – Statistically significant union pathways referring to the miRNAs with increased expression on the day 5.....	57
Table 6 – Statistically significant union pathways referring to the miRNAs with decreased expression on the day 5.....	58

Lista de abreviaturas e siglas

DNA	Ácido desoxirribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
PDGF-BB	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RNA	Ácido ribonucleico

Sumário

1 Introdução.....	11
2 Objetivo Geral	14
2.1 Objetivos Específicos.....	14
3 Revisão de Literatura	15
3.1 Os microRNAs	15
3.1.1 Histórico dos miRNAs	15
3.1.2 Biogênese dos miRNAs	16
3.1.3 Processos biológicos	18
3.2 Cicatrização da pele	20
3.2.1 Fases da cicatrização da pele.....	21
3.2.2 Complicações relacionadas à cicatrização da pele.....	22
3.3 Abordagens terapêuticas	24
3.4 Aplicação dos miRNAs	26
3.4.1 Aplicação dos miRNAs na cicatrização da pele	26
3.5 Utilização de revisão sistemática como metodologia de compreensão do panorama dos miRNAs associados à cicatrização da pele Aplicação dos miRNAs na cicatrização da pele	30
4 Manuscrito Científico	32
5 Discussão.....	74
6 Conclusão	79
Referências	80

1 Introdução geral

MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA endógeno constituídas de 19 a 25 nucleotídeos capazes de controlar a expressão gênica a nível pós-transcricional (LU et al., 2018). Considerados como importantes potenciais biomarcadores, um único miRNA pode ter como alvo centenas de RNAs mensageiros (mRNAs) e dessa maneira, pode influenciar a expressão de inúmeros genes em diferentes vias de sinalização (CATALANOTTO et al., 2016).

Estas moléculas podem se combinar formando complexas rede capazes de, de uma maneira conjunta, regular a diferenciação celular, o desenvolvimento, a homeostase, dentre outros processos (ALMEIDA et al., 2011). Desde a descoberta do primeiro miRNA em nematóides, em meados dos anos 90, ainda que com um conhecimento não tão profundo à época, já havia sido constatado o seu importante papel como molécula-chave quanto à regulação de processos biológicos em animais. Conforme o crescimento exponencial do conhecimento acerca do tema, a relevância do miRNAs também foi destacada em processos biológicos presentes em plantas (ZHANG & WANG, 2014).

O miRNA é uma temática recente, visto de quando data sua descoberta, mas é inegável que os decorrentes avanços e dentre outras descobertas referente à biologia dos pequenos RNAs, foram fatores essenciais para uma compreensão constantemente mais elucidativa destas moléculas, que reconduziram o panorama da regulação genética a nível pós-transcricional (BHASKARAN & MOHAN, 2013; O'BRIEN et al., 2018).

Devido à capacidade de regular inúmeros genes-alvo, a sua relação com diversos processos biológicos, e até mesmo patológicos, é totalmente justificada (CREUGNY et al., 2018). A relação dos miRNAs ao desenvolvimento de qualquer processo patológico pode ser explicada por alguma desregulação funcional, e está associada a diversas patologias humanas, como o câncer (GEBERT & MACRAE 2018), doenças cardiovasculares (RUIPAMOOLE & SLACK, 2017) e neurodegenerativas (JUŻWIK et al., 2019).

A regulação da expressão gênica pelo miRNA se dá através, principalmente, da degradação ou da repressão da tradução de seus genes-alvo (TIWARI et al., 2017). Entretanto, além dos mecanismos anteriormente citados, os miRNAs também podem

regular a expressão gênica através da metilação DNA ou da modificação de histonas (BOSCAINO et al., 2019).

Os miRNAs ainda estão envolvidos em vários processos biológicos que compreendem desde o desenvolvimento embrionário às principais funções celulares, tais como proliferação, diferenciação e apoptose (HUANG et al., 2010). Não somente, ainda possuem importante relação com a resposta imune através da regulação de seus genes-alvo (CIFUENTES-BERNAL et al., 2020) e com a angiogênese (LIANG et al., 2018).

Em se tratando de cicatrização da pele, o aumento da expressão de determinados genes e repressão de outros são os pontos-chave ocorridos durante o processo que, por sua vez, também ocorrem sob regulação do miRNAs (BANERJEE & SEN, 2015). A cicatrização é mais um dos processos em que os miRNAs são capazes de regular, visto que é neste momento onde transcorrem, em especial, a migração de fibroblastos, a reepitelização e angiogênese, eventos dos quais são influenciados pela expressão dos miRNAs (TÜFEKCI et al., 2013).

Ainda que a pesquisa acerca dos miRNAs na área de cicatrização da pele encontre-se em fase inicial, vários estudos já têm evidenciado que os miRNAs são parte importante do processo de cicatrização (GUO et al., 2016; BI et al., 2017; CAO et al., 2017). Em indivíduos saudáveis, muitos deles são capazes de acelerar o processo de cicatrização (SOLIMAN et al., 2018). O mesmo já foi reportado em pacientes com diabetes mellitus tipo 2, onde o miR-27b resgatou a função de células angiogênicas derivadas da medula óssea, acelerando a cicatrização de feridas de indivíduos diabéticos (WANG et al., 2013). A alteração no padrão de expressão do miRNA também pode estar associada ao desenvolvimento de doenças como o diabetes, o miR-377 quando apresenta um acréscimo de sua expressão resulta em um aumento da produção de fibronectina em pacientes com nefropatia diabética (WANG et al., 2008).

Recentemente, os miRNAs também têm demonstrado grande importância no processo de cicatrização de feridas crônicas. Já foi observado que muitos miRNAs expressos durante o processo normal de cicatrização de feridas podem ser encontrados desregulados em feridas crônicas (MULHOLLAND et al., 2017). Em um estudo recente que analisou a expressão do miRNAs em roedores com diabetes induzidos, foi constatado o aumento na expressão de 18 miRNAs e diminuição de 65, quando comparados ao grupo controle (LIU et al., 2015). Essa evidência, sugere o quão relevante a utilização de diferentes miRNAs como possíveis alternativas terapêuticas pode ser relevante para o tratamento e feridas crônicas.

À vista disso, a elucidação sobre o complexo panorama dos miRNAs, suas respectivas vias de sinalização e seus níveis de regulação se faz de grande

importância para melhor entender a relação de tais moléculas com o processo de cicatrização da pele. Além disso, por conjectura, esse conhecimento pode ser aplicado no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas direcionadas à cicatrização de feridas (LI et al., 2017; CHEN et al., 2019). Entretanto, embora nos últimos anos o acervo de trabalhos científicos e demais pesquisas acerca dos miRNAs tenham crescido (HAMMOND, 2015), ainda existe uma considerável escassez em estudos que relacionem a rede de miRNAs e suas vias de sinalização associadas ao processo de cicatrização da pele (WITWER & HALUSHKA, 2016; GIORGI et al., 2020).

Assim sendo, torna-se evidente a necessidade de estudos capazes de preencher a lacuna ainda existente referente aos miRNAs associados ao processo de cicatrização da pele. Dessa forma, possibilitando uma análise nítida de quais miRNAs podem influenciar o processo, é possível direcionar os desfechos encontrados para o desenvolvimento de novas terapias alternativas aplicadas à cicatrização de feridas.

2 Objetivo Geral

Revisar sistematicamente a literatura de estudos disponíveis relativos à análise *in vivo* do padrão de expressão do miRNAs durante a cicatrização da pele, bem como, das vias de sinalização associadas em animais.

2.1 Objetivos Específicos

1. Selecionar junto às bases de dados, através de pesquisa eletrônica com estratégia de busca previamente definida, os estudos disponíveis relativos à análise do padrão de expressão do miRNAs e suas respectivas vias de sinalização durante a cicatrização da pele.
2. Definir os critérios de elegibilidade – de inclusão e exclusão – e, posteriormente, aplicá-los junto às referências encontradas na busca eletrônica.
3. Reunir os resultados obtidos a partir dos artigos selecionados com base nos critérios de elegibilidade, tabulá-los, analisá-los e interpretá-los.
4. Identificar e interpretar os resultados obtidos através de análises bioinformáticas.

3 Revisão de Literatura

3.1 Os microRNAs

MiRNAs são pequenas moléculas de RNA endógeno não-codificantes constituídas de aproximadamente 22 nucleotídeos, sua expressão é célula e tecido-específica e sua regulação é transitória. (DE PLANELL-SAGUER & RODICIO, 2011; TIAN et al., 2015). São responsáveis por controlar a expressão gênica pós-transcricionalmente, por essa razão, estão envolvidos em uma vasta diversidade de processos desde de desenvolvimento a fisiológicos, e sua desregulação pode ocorrer no desenvolvimento de determinadas condições patológicas (ASSMANN et al., 2017; LU et al., 2018).

Devido a sua capacidade de regulação da expressão gênica, os miRNAs são classificados como importantes biomarcadores. Além disso, um único miRNA pode ter como gene-alvo vários mRNAs, o que sugere a sua repercussão na expressão de diferentes genes em diferentes vias de sinalização (CATALANOTTO et al., 2016; FARAHANI et al., 2020).

3.1.1 Histórico dos miRNAs

O primeiro miRNA foi descoberto em 1993 no nematóide *Caenorhabditis elegans* (LEE et al., 1993). Alguns anos mais tarde, dois grupos de pesquisa, de forma individual, relatam a presença de um pequeno RNA até então desconhecido, o let-7. Com a produção de novos estudos acerca da descoberta, foi constatado que a recente molécula mostrava-se essencial para o desenvolvimento de um estágio larval posterior ao adulto em *C. elegans* (REINHART et al., 2000; SLACK et al., 2000). Ainda, homólogos do gene codificante para o miR-let-7 foram, subsequentemente, identificados em muitos outros organismos, incluindo humanos (PASQUINELLI et al., 2000).

O período que se seguiu a partir da identificação do primeiro miRNA, foi marcado por uma avalanche de novas informações e descobertas. Nessa ocasião, inúmeros miRNAs foram encontrados evolutivamente conservados entre diferentes espécies (BARTEL, 2004). E após o reconhecimento e confirmação desses pequenos RNAs, agora denominados de miRNAs, o desenvolvimento de pesquisas que objetivavam identificar os demais membros dessa família cresceu intensamente, resultando em

cada vez mais descobertas de diversos miRNAs identificados em diferentes espécies de plantas e animais (BHASKARAN & MOHAN, 2013).

Junto às inúmeras descobertas que vinham sendo realizadas à época, foi necessário o desenvolvimento de uma base de dados para o armazenamento de sequências e anotações acerca dos miRNAs. O miRBase foi criado em 2002 e é, até o momento, o principal repositório online que contém as sequências e anotações dos miRNAs, a nomenclatura e informações sobre genes-alvo (GRIFFITHS-JONES, 2003; GRIFFITHS-JONES et al., 2008). A versão mais recente do miRBase (v22) armazena as sequências de microRNA de 271 organismos, destes mais de 38 mil são precursores de miRNA e aproximadamente 50 mil são miRNAs maduros (KOZOMARA et al., 2018).

3.1.2 Biogênese dos miRNAs

A biogênese do miRNA ocorre sobre controle de espaço e de tempo, e sua desregulação pode ser associada ao desenvolvimento de diversos processos patológicos, como exemplo, o câncer (HA & KIM, 2014). Inicia-se com a transcrição do gene codificante de determinado miRNA pela RNA polimerase II ou III, resultando no chamado transcrito de miRNA primário (prim-miRNA), constituído por centenas a milhares de nucleotídeos e contendo Cap 5' e cauda poli-A. (MATSUYAMA & SUZUKI, 2020). O pri-miRNA apresenta uma estrutura chamada *hairpin* (do inglês: grampo de cabelo), a qual é clivada, ainda no núcleo, pela RNase, Drosha e seu cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*, do inglês: gene 8 da região crítica da síndrome de DiGeorge). Essa clivagem irá gerar a molécula precursora do miRNA maduro, o pré-miRNA, contendo de 50 a 70 nucleotídeos (VISHNOI & RANI, 2016). Logo, o pré-miRNA é transportado para o citoplasma através da exportina-5 (Exp5), proteína responsável por realizar a transposição núcleo-citoplasma utilizando o Ran-GTP como cofator (MICHLEWSKI & CACERES, 2018). Já no citoplasma, o pré-miRNA será processa pela Dicer, uma RNase III, gerando um miRNA fita dupla constituído por aproximadamente 22 nucleotídeos (MATSUYAMA & SUZUKI, 2020). Na sequência, esse produto será incorporado a um complexo multimérico denominado RISC (*RNA induced silence complex*, do inglês: complexo de silenciamento induzido por RNA) que, por sua vez, incluirá as proteínas Argonautas como principais constituintes do complexo. No complexo RISC, permanecerá apenas uma das fitas do miRNA fita dupla, a qual irá regular a expressão pós-transcricional do(s) gene(s)-alvo (GLAICH et al., 2019). O mecanismo responsável pela biogênese dos miRNAs podem ser observados nas figuras 1 e 2 abaixo.

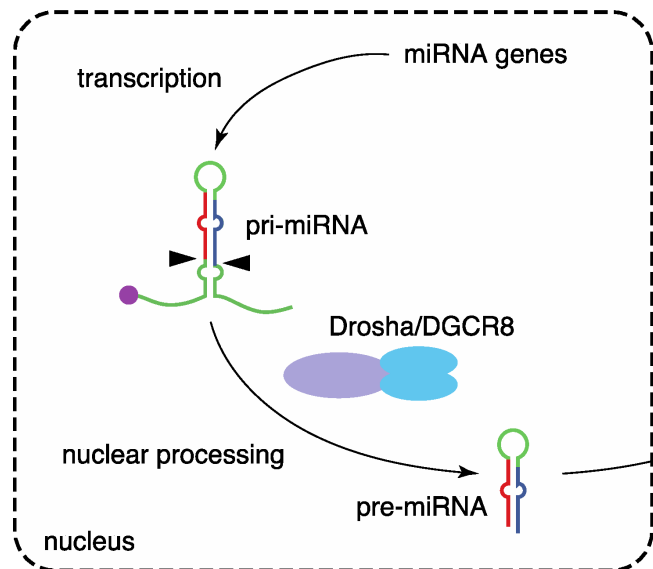


Figura 1: Ilustração da biogênese dos microRNAs.
Fonte: MATSUYAMA & SUZUKI, 2020, p. 2.

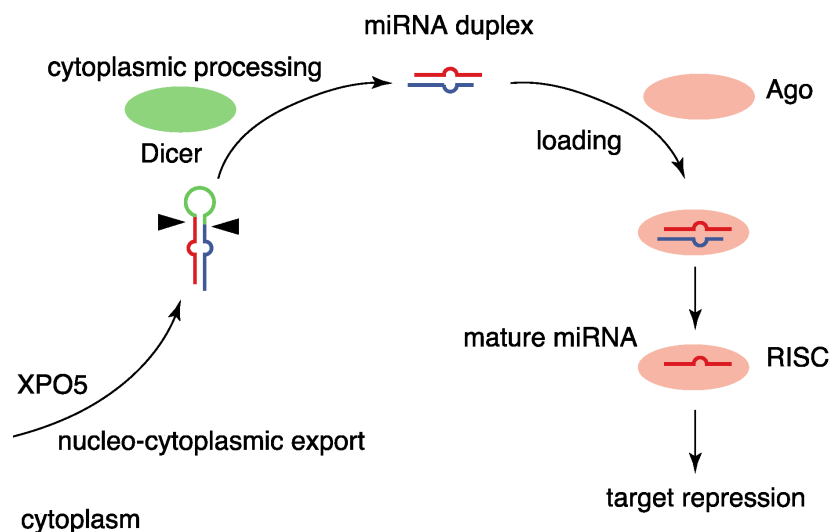


Figura 2: Ilustração da biogênese dos microRNAs.
Fonte: MATSUYAMA & SUZUKI, 2020, p. 2.

O padrão de expressão alterado em qualquer um dos componentes da maquinaria responsável pela biogênese, com foco nas enzimas Drosha e Dicer e nas proteínas Argonautas, pode ser associado ao desenvolvimento de diversas doenças, evidenciando a importância desse processo para um funcionamento adequado do organismo (ACHKAR et al., 2016). A regulação da biogênese dos miRNAs pode ocorrer em diferentes níveis, desde a transcrição ao processamento pela Drosha ou pela Dicer (WU et al., 2018).

3.1.3 Processos biológicos

Considerando o importante papel regulatório dos miRNAs na expressão gênica, a sua assinatura nos mais diversos processos biológicos é uma consequência totalmente lógica e justificável. Já foi relatado, em diversos estudos, que os miRNAs exercem importante desempenho no desenvolvimento de muitos processos biológicos (WOJCIECHOWSKA et al., 2017; QING et al., 2018). A alteração do padrão de expressão dos miRNAs também é capaz de desencadear a patogênese de diversas doenças (GABISONIA et al., 2019; ZHANG et al., 2019).

Nos anos seguintes à descoberta do primeiro miRNA, vários estudos evidenciavam a relação da desregulação do miRNA com o desenvolvimento de doenças humanas. Em 2004, tal desregulação foi associada a câncer de pulmão em humanos (TAKAMIZAWA et al., 2004). Um ano depois, a desregulação da expressão passou a ser relacionada a mais de um tipo de câncer, e ainda foi observado que a análise do perfil de expressão de miRNA seria um biomarcador mais fidedigno para detecção de câncer quando comparado ao perfil de mRNA (LU et al., 2005).

Ainda hoje, a temática envolvendo a desregulação de miRNAs com o desenvolvimento do câncer é recorrente. Os genes supressores de tumor e os oncogenes têm sua expressão perturbada devido à disfunção de determinados miRNAs, o que implica na patogênese do câncer (ALI SYEDA et al., 2020). Em inúmeros miRNAs já foram observados que a desregulação positiva ou negativa reflete diretamente no desenvolvimento de câncer, podendo, dessa maneira, atuar como oncomiRs ou miRs oncosuppressores (MOLLAEI et al., 2018). O mecanismo subjacente à desregulação da expressão de miRNAs pode ter sido recentemente descoberto e ainda não completamente elucidado. Entretanto, sabe-se que a amplificação, deleção ou metilação dos *loci* genômicos de miRNAs,

além da regulação mediada por fatores de transcrição são as principais circunstâncias capazes de alterar o padrão de expressão de miRNA no câncer (VERDUCI et al., 2019). As etapas que ocorrem durante o processo de biogênese do miRNA também são suscetíveis a possíveis disfunções, por essa razão, também podem causar alterações na expressão de miRNAs, mesmo que em uma proporção menor (CHEN et al., 2020).

As possibilidades de desregulação da expressão de miRNA já mostraram seus efeitos no desenvolvimento de câncer de pulmão (TUO et al., 2018), câncer de mama (KONG et al., 2018), câncer gástrico (LI et al., 2018) e câncer colorretal (GMEREK et al., 2019). A biologia do miRNA também pode ser associada ao desenvolvimento de outras patologias, como doença cardiovascular (WOJCIECHOWSKA et al., 2017), doença de Alzheimer (PUTTEERAJ et al., 2017; KUMAR & REDDY, 2019) e diabetes (VASU et al., 2019). Em indivíduos diabéticos, o miR-24 foi capaz de aumentar a produção e a secreção de insulina (XIA et al., 2010). A diminuição na produção, por sua vez, já foi relacionada com o miR-204 (XU et al., 2013). Os miRNAs miR-155, miR-129 e miR-355 foram capazes de promover a cicatrização de feridas diabéticas (YE et al., 2017; WANG et al., 2018).

As funções regulatórias dos miRNAs também refletem em inúmeros processos biológicos, desde algumas das principais funções celulares, como diferenciação, proliferação e apoptose, a respostas imunes através da regulação de seus genes-alvo (NACHTERGAELE & HE, 2016). Há estudos recentes que indicam que os miRNAs desempenha seu papel regulatório na grande maioria dos processos de desenvolvimento (O'BRIEN et al., 2018; KINSER & PICUS, 2019; DEXHEIMER & COCHELLA, 2020). As primeiras análises do papel do miRNA no desenvolvimento começaram com a geração de linhagens de camundongos geneticamente modificados para não expressar as proteínas Dicer e Argonata (LIU et al., 2004). Logo, em embriões de *Danio rerio*, a deficiência da enzima Dicer foi constatada ser letal, capaz de causar interrupção do desenvolvimento (LEE et al., 2006). Os miRNAs além de serem essenciais para o desenvolvimento embrionário, também

são de grande importância para a gametogênese (KASPER et al., 2017). É durante o estágio pré-implantação de desenvolvimento do embrião, em que os miRNAs são secretados para o ambiente extracelular por diferentes tipos celulares, através de fluidos biológicos, ou pelo próprio embrião (GROSS et al., 2017).

Além disso, alguns processos celulares, como diferenciação, proliferação e apoptose, também estão sujeitos à regulação do miRNA. Diferentes miRNAs, tais como miR-142, miR-181 e miR-223, já foram observados sendo especificamente expressos em tecidos hematopoiéticos, propiciando a rede de fatores de transcrição e crescimento necessária ao processo de diferenciação celular (YAO, 2016). No desenvolvimento do sistema nervoso de *Danio rerio*, o silenciamento do gene codificante para a enzima Dicer, afetou a diferenciação de células neurais (GIRALDEZ, 2005). Além da diferenciação, os miRNAs já mostraram influência na proliferação de células-tronco neurais e formação de sinapses (MA et al., 2019). Os miRNAs também participam de muitas vias de sinalização do ciclo celular, inclusive de células-tronco (OTTO et al., 2017; MENS & GHANBARI, 2018). Ademais, podem regular vários estágios da angiogênese agindo como estimuladores e inibidores angiogênicos com intuito de manter o equilíbrio do processo (TIWARI et al., 2017). A angiogênese pode estar envolvida na patogênese de várias doenças, mas também na manutenção de processos biológicos normais do organismo, como o desenvolvimento embrionário e cicatrização de feridas (ZAO et al., 2019). A cicatrização da pele pode ser afetada por vários fatores ou condições, dentre eles: o miRNA.

3.2 Cicatrização da pele

A cicatrização da pele é um dos mais complexos processos do organismo e apresenta um mecanismo de função celular extremamente particular (RODRIGUES et al., 2019). É requerida uma importante sincronização espacial e temporal entre fatores de crescimento, citocinas e uma variedade de tipos celulares que resultarão em diferentes

consequências em cada uma de suas fases (ELLIS et al., 2018).

O processo de cicatrização pode ser definido com uma interação detalhadamente orquestrada entre o sistema imunológico, células dérmicas e queratinócitos (KRZYSZCZYK et al., 2018), onde a finalidade é restaurar a integridade de um tecido lesado (TOTTOLI et al., 2020). Entretanto, devido à complexidade do processo e as inúmeras etapas e vias que o compõe, muitos são os fatores ou condições que podem limitar o processo de reparo do tecido (LIU et al., 2018).

Nos momentos seguintes à lesão do tecido, uma cascata de eventos é iniciada: a vasoconstrição dos vasos sanguíneos aliada à agregação plaquetária interrompe o sangramento no local da lesão (WALLACE et al., 2017). E em seguida, inúmeras células inflamatórias, como os neutrófilos, são recrutadas, e passam a liberar mediadores e citocinas capazes de promover, principalmente, a angiogênese e a reepitelização (EL AYADI et al., 2020). No decorrer do processo de cicatrização da pele, diversos tipos celulares são recrutados, e cada uma dessas células contribuirá de maneira diferente para cada uma das quatro fases da cicatrização (SCAPAGNINI et al., 2019).

3.2.1 Fases da cicatrização da pele

No processo de cicatrização da pele são observados os estágios de hemostasia, inflamação, angiogênese, reepitelização, e remodelação, os quais ocorrem em uma sequência temporal, mas também podem se sobrepor (MERCANDETTI & COHEN, 2017). Por essa razão, didaticamente, a cicatrização é dividida nas seguintes fases: fase inflamatória, proliferativa e de remodelamento (SERRA et al., 2017). A fase inflamatória é caracterizada pela hemostasia e quimiotaxia. Ademais, é nessa fase onde ocorre o aumento da permeabilidade vascular, o que limita maiores danos ao tecido lesado pois propicia o fechamento da ferida, além de subtrair resíduos celulares e bactérias e promover o início da migração celular. A duração da fase inflamatória pode variar entre três a cinco dias (OPNEJA et al., 2019; SHUKLA et al., 2019).

Durante a fase proliferativa, também pode ser observada a

reepitelização, mas é, principalmente, caracterizada pela formação de tecido de granulação e neovascularização (RODRIGUES et al., 2019), pode durar de uma a várias semanas, a depender de determinados fatores, como o grau da lesão (OPNEJA et al., 2019).

A fase de remodelamento, também chamada de fase de maturação, é caracterizada pela transição do tecido de granulação ao tecido cicatricial (WALLACE et al., 2017). É nesse momento em que ocorre a desaceleração da angiogênese e a substituição do colágeno tipo III pelo tipo I no tecido de granulação. Essa fase tem a importante participação dos miofibroblastos - originados a partir dos fibroblastos -, responsáveis pela contração da ferida (ELLIS et al., 2018). De uma maneira geral, a partir do ponto de vista da maioria das configurações clínicas, o fechamento da ferida, seja em casos agudos ou crônicos, é considerado o ponto final do processo de cicatrização. Contudo, as cicatrizes podem continuar sofrendo remodelação ou maturação do tecido por meses ou até mesmo por anos (OPNEJA et al., 2019).

3.2.2. Complicações relacionadas à cicatrização da pele

O processo de cicatrização da pele é extenso além de complexo, e devido aos inúmeros estágios e fases que o caracterizam, a propensão a falhas é considerável. Ainda, as causas das feridas não são homogêneas, podem advir de cirurgias, lesões ou fatores externos, como cortes ou queimaduras, ou de condições patológicas, como diabetes. Essa miscelânea na provável origem da ferida é mais um agravante para a ocorrência de falhas durante o curso do processo (RODRIGUES et al., 2019).

As disfunções que podem ocorrer durante o processo classificam-se, basicamente, em feridas agudas ou crônicas, a depender de causas e consequências subjacentes (OPNEJA et al., 2019). Alguns fatores sistêmicos, como a idade do paciente, a presença de doenças autoimunes, metabólicas ou vasculares e até o uso de determinados medicamentos podem afetar o processo de cicatrização, também

(SHUKLA et al., 2019). Além de fatores externos, as complicações relacionadas à cicatrização podem ter origem a partir do próprio processo, como ocorrem nas cicatrizações hipertróficas devido à hiperatividade de fibroblastos (KARPPINEN et al., 2019). Ou apenas originar-se a partir de uma resposta exacerbada ao processo de cicatrização, no caso de quelóides (GLASS, 2017). Há, ainda, as feridas crônicas, as quais não são capazes de atingir a integridade anatômica e funcional ideal do tecido lesado (HAN & CEILLEY, 2017).

As feridas crônicas são definidas como aquelas em que a cicatrização não decorre normalmente ou torna-se demasiadamente lenta, se estendendo por mais de seis meses. E são, geralmente, associadas, a doenças como o diabetes (TOTTOLI et al., 2020). O processo de reparo é desordenado, e podem ser classificadas em úlceras vasculares – venosas e arteriais –, úlceras diabéticas e úlceras de pressão, principalmente (HAN & CEILLEY, 2017).

A problemática acerca das feridas crônicas é expressiva e suas consequências lesam não apenas o paciente, mas também o sistema de saúde, principalmente devidos aos prolongados tratamentos que são necessários (JÄRBRINK, 2016). Por essas razões, as feridas crônicas já são consideradas um problema de saúde pública, principalmente na população idosa. Além disso, estima-se que pelo menos 5% da população adulta de países ocidentais são afetados por esse problema (SEN, 2019). No Brasil, a cada ano surge 570 mil novos casos de pacientes afetados por feridas crônicas. Hoje, o total de brasileiros acometidos é cinco milhões (SOBEST, 2020).

A nível internacional, essas consequências também podem ser observadas: no Reino Unido, os gastos com pacientes acometidos por feridas crônicas em 2014 era de 2,5 bilhões de dólares, aproximadamente; em 2020 esse número chegou 3,5 bilhões de dólares. Nos Estados Unidos, esse problema acomete 2% da população no geral, e 15% da população maior de 65 anos (JÄRBRINK, 2016). O número de pacientes afetados está crescendo anualmente no país, devido ao aumento na prevalência de diabetes e outras doenças crônicas, e por consequência, gerando maiores gastos aos sistemas de atendimento

médico. Além disso, estima-se que uma única úlcera diabética pode chegar a custar 50 mil dólares, resultando em um custo anual superior a 25 bilhões de dólares para o país (HAN & CEILLEY, 2017; SEN, 2019).

3.3 Abordagens terapêuticas

As principais terapias atualmente disponíveis para as feridas crônicas partem do princípio de minimizar os efeitos da doença de base, como o diabetes, por exemplo. Para então, corrigir os fatores que possam interferir de maneira negativa no processo de cicatrização da pele (POWERS et al., 2016). Os tratamentos devem, necessariamente, propiciar um ambiente favorável para o desenvolvimento de tecido viável com boas oxigenação e vascularização, o chamado tecido de granulação, sem que haja sinais de infecção, garantindo uma cicatrização mais adequada e rápida (KRZYSZCZYK et al., 2018).

A terapia por pressão negativa (TPN) é uma das atuais abordagens terapêuticas disponíveis utilizadas para o tratamento de feridas complexas, como as crônicas. Consiste em promover a cicatrização através de uma pressão subatmosférica controlada e aplicada localmente em ambiente úmido e controlado (LIU et al., 2018). Contudo, pode apresentar algumas limitações, como o surgimento de necrose e fístulas sobre a ferida, a exposição de vasos, nervos e órgãos, dentre outras (HUANG et al., 2014).

A aplicação de fatores de crescimento também é uma alternativa ao tratamento de feridas crônicas, visto que são capazes de acelerar o processo de cicatrização. Contudo, uma vez que a aplicação necessite ser local, a principal consequência será a rápida degradação dos fatores de crescimento devido ao ambiente proteolítico em que se encontram. Ademais, até o momento, o único fator de crescimento liberado para o tratamento de úlceras crônicas é o PDGF-BB (FAN et al., 2010; YAMAKAWA & HAYASHIDA, 2019).

A cicatrização de feridas crônicas também podem ser tratadas através da oxigenoterapia hiperbárica, alternativa bastante comum entre

pacientes diabéticos. Esse tratamento consiste no aumento da quantidade de oxigênio dissolvido nos tecidos. A alta concentração é responsável por propiciar a vascularização de vasos sanguíneos e linfáticos. Além disso, o método já mostrou seu potencial anti-inflamatório (GOTTRUP et al., 2017). Há algumas limitações associadas à técnica que podem impedir que o paciente utilize de tal tratamento: indivíduos com pneumotórax não tratado ou durante a administração de quimioterápicos (Bleomicina e Doxorubicina) e da medicação Sulfamylon (MEMAR et al., 2019).

Embora atualmente haja uma considerável pluralidade de terapias disponíveis para o tratamento de feridas, é nítido que todas elas apresentam determinadas limitações (PEREIRA & BARTOLO, 2016). Ademais, considerando o impacto das feridas crônicas na vida dos pacientes e no sistema de saúde os quais estão inseridos, se faz necessário o aprimoramento de tais terapias já disponíveis, tornando-as mais direcionadas, através da utilização de diferentes compostos farmacêuticos, como fatores de crescimento (POWERS et al., 2016).

A procura por novas alternativas terapêuticas que busquem tratar as feridas a nível molecular também é um caminho capaz de contornar a problemática relacionada a feridas, principalmente as crônicas. As terapias genéticas de terceira geração, ainda que não sejam uma abordagem terapêutica completamente acessível e tão popularizada, têm se mostrado extremamente eficazes no tratamento de feridas crônicas, como as que utilizam os miRNAs para promover a cicatrização da pele (MENG et al., 2017; MULHOLLAND et al., 2017; SALEH et al., 2019). Atualmente, existem vários miRNAs sendo estudados com potencial utilização em terapia genética (HU et al., 2018; BAN et al., 2020 HE et al., 2020). No entanto, por ser uma temática bastante atual, ainda há muitos pontos a serem elucidados e melhor entendidos, como de que maneiras poderiam auxiliar na cicatrização, através de quais via de sinalização, além do desenvolvimento de um eficiente sistema de entrega que seja capaz de transpor as barreiras intra e extracelulares (MULHOLLAND et al., 2017).

3.4 Aplicação dos miRNAs

Os miRNAs, principalmente quando comparados a grande maioria das outras moléculas, podem ser considerados um tópico bastante atual dada a data de sua descoberta, apenas em meados nos anos 90 (LEE et al., 1993). Apesar de ser um assunto consideravelmente novo, o número de periódicos que contemplem a temática cresceu exponencialmente nos últimos anos (CIRILLO et al., 2019). A cada publicação, novas famílias de miRNAs com dezenas de membros eram descritas, e com isso novas funcionalidades eram descobertas (PENG & CROCE, 2016). E, dessa forma, novas aplicações nos mais diversos seguimentos, mas principalmente nos que refere-se a diagnóstico e terapia, foi a consequência mais legítima para os vários miRNAs que foram e vêm sendo descritos durante os últimos esses anos.

O conceito acerca dos miRNAs sofreu expressivas alterações nos últimos. Anteriormente, eram considerados como “lixo transcricional” por não serem capazes de traduzir proteínas. Hoje são conhecidos, sobretudo, pelo seu importante papel regulatório em processos biológicos e patológicos (CECH & STEITZ, 2014). Mas além disso, o seu alto estado de conservação entre as espécies também é um dos fatores que ainda chamam a atenção da comunidade científica e que reflete nas suas várias possíveis aplicações (O'BRIEN et al., 2018). A expansão nas pesquisas envolvendo os miRNAs pode ser refletida no miRBase. Em seu penúltimo lançamento, datado de 2014, o banco de dados informou que já continham mais de 28 mil precursores de miRNA em 100 diferentes espécies, e que esses números representavam, aproximadamente, um aumento de mais de um terço em relação à análise anterior (FRIEDLÄNDER et al., 2014).

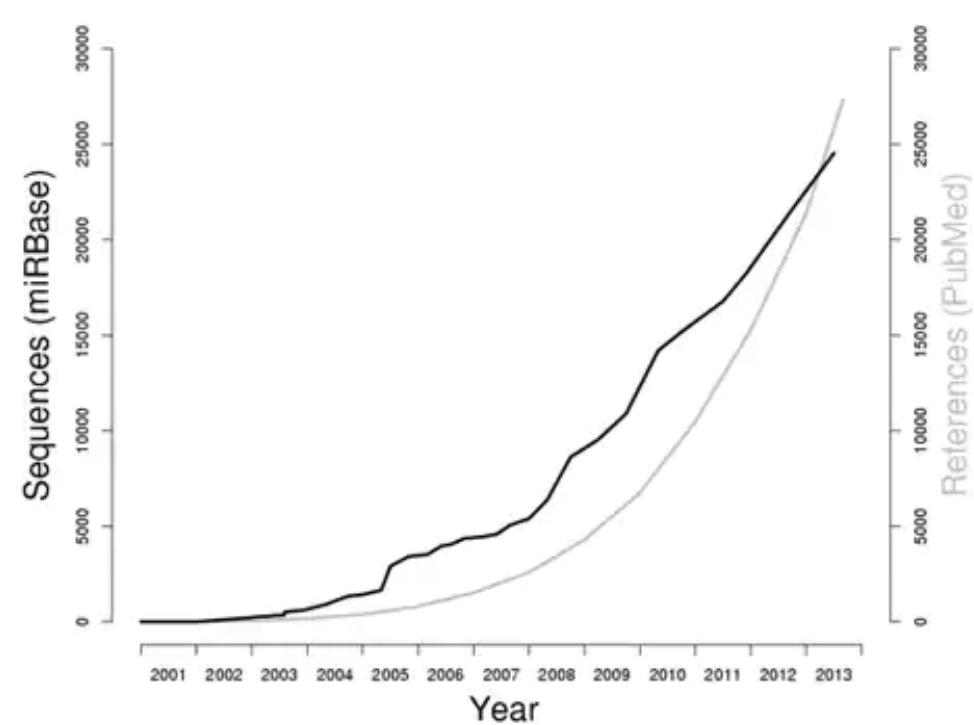


Figura 3: Gráfico do número de miRNAs indexados no banco de dados miRBase de 2003 a 2013.
Fonte: www.abcam.com/kits/the-rise-and-rise-of-mirna-research-1

Já no seu lançamento mais recente, em 2018, mais de 38 mil precursores de miRNAs de 271 organismos diferentes foram identificados, esses precursores são capazes gerar mais de 40 mil diferentes sequências de miRNAs maduros (KOZOMARA et al., 2018). Ademais, muitos estudos salientam a possibilidade de haver, ainda, muitos miRNA a serem descobertos (FRIEDLÄNDER et al., 2014; PENG & CROCE, 2016; KOZOMARA et al., 2018).

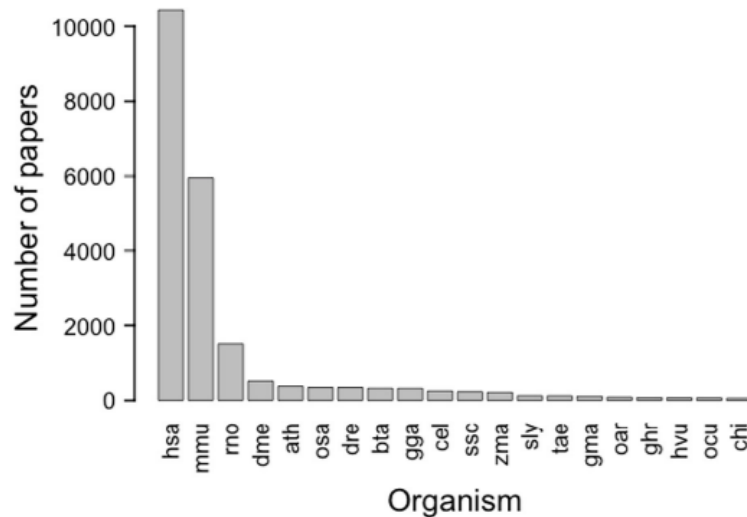


Figura 4: Gráfico das principais espécies de acordo com o número de artigos associados a MicroRNAs.
Fonte: KOZOMARA et al., 2020, p. 5.

Atualmente, estima-se que pelo menos 60% do genoma humano possa ser regulado pela ação dos miRNAs, intervindo em vários aspectos das atividades celulares, desde a proliferação à morte celular (SHU et al., 2017). Os miRNAs não apenas são moduladores epigenéticos, como também podem ser modulados pela epigenética, através da metilação do DNA ou modificação de histonas, por exemplo (YAO et al., 2019). Essa combinação gera um loop entre miRNAs e epigenética, o que resulta em uma grande influência sobre a expressão gênica (CHEN et al., 2018). Por essa razão, os miRNAs representam potenciais moléculas para o desenvolvimento de biomarcadores para processos biológicos e patológicos (YAO et al., 2019). Além disso, a sua utilização como biomarcador pode ser favorecida por tornar o método não invasivo, devido a sua localização intracelular (SALIMINEJAD et al., 2018). Também já foram encontrados estáveis no sangue e na urina em virtude de sua ligação com os exossomos, resistindo à degradação enzimática através de ribonucleases (MALL et al., 2013).

A aplicação dos miRNAs como biomarcador é bastante útil na identificação de determinados processos patológicos e também em processos biológicos que possam estar em desequilíbrio no organismo

(RUPAIMOOLE et al., 2017). A utilização como biomarcador reflete na aplicação de possíveis terapias para corrigir eventuais falhas nesses processos, como a cicatrização da pele em feridas crônicas (MULHOLLAND et al., 2017). Vários estudos têm abordado o miRNA como potencial alvo terapêutico em diferentes segmentos.

3.4.1 Aplicação dos miRNAs na cicatrização da pele

Os miRNAs têm se mostrado importantes moléculas para o desenvolvimento de terapias no que diz respeito à cicatrização da pele, especialmente para feridas crônicas. O miR-132 já foi encontrado com uma diminuição significativa na sua expressão em úlceras diabéticas humanas (LI et al., 2015). A reposição local de miR-132 em feridas induzidas de camundongos db / db acelerou o processo de cicatrização, e ainda foi capaz de aumentar os queratinócitos na borda da ferida e reduzir a inflamação no local (LI et al., 2017). As etapas da cicatrização em que os miRNAs podem ser aplicados como alvo terapêutico, são diversas. Como angiogênese, que é regulada pelo miR-148b através da via fator de crescimento transformador beta (TGF- β), além do processo de transição endotelial para mesenquimal (MISCIANINOV et al., 2018). A combinação dos miRNAs com outras substâncias também já foi reportada como favorável ao processo de cicatrização, como a utilização de nanopartículas de óxido de cério conjugadas ao miR-146a, a qual foram utilizadas para corrigir a deficiência encontrada na cicatrização de feridas diabéticas (ZGHEIB et al., 2018).

Em se tratando de respostas exacerbadas à cicatrização, o miR-203 é capaz modular, além da cicatrização da pele, a formação de cicatrizes através da supressão de Hes1 (ZHOU et al., 2018). Bem como, o miR-149, atenuando a resposta inflamatória (LANG et al., 2017). A cicatrização hipertrófica também pode ser modulada, já que através da regulação da expressão da Smad2, o miR-486-5p é capaz de inibir o crescimento de fibroblastos responsáveis pela hipertrofia da cicatriz (SHI et al, 2018). Em quelóides, o padrão de expressão dos miRNAs também encontra-se alterado, afetando inúmeras vias sinalização relevantes para a

patogênese dos quelóides (LUAN et al., 2016). Através da via de sinalização PTEN/AKT, o miR-21 também pode desempenhar importantes modulações na proliferação e diferenciação de fibroblastos (LI et al., 2017).

Os estudos citados abordam uma gama bastante ampla no que concerne às terapias em potenciais utilizando os miRNAs na cicatrização da pele. No entanto, podem ser observadas algumas limitações, tais como a necessidade de melhor compreender através de quais vias de sinalização os miRNAs atuam na cicatrização, ou ainda, a necessidade do desenvolvimento de um sistema de entrega adequado e eficaz para integridade da molécula (CHEN et al., 2014). Evidentemente, todas essas limitações relacionadas, podem ser contornadas com a compreensão do panorama dos miRNAs associados à cicatrização da pele, através de metodologias capazes de avaliar e analisar os estudos disponíveis acerca do assunto de forma objetiva e imparcial, seguindo um processo sistemático, tal qual a revisão sistemática (BOICE, 2019).

3.5 Utilização de revisão sistemática como metodologia de compreensão do panorama dos miRNAs associados à cicatrização da pele

A aplicação de revisões sistemáticas na área da ciência da saúde tem se tornado cada vez mais frequente e completamente plausível (CHALMERS & FOX, 2016). Metodologias como essa podem ser utilizadas para diversas finalidades, desde o pesquisador que as utiliza com intuito de fundamentar seus trabalhos ao médico que busca por atualizações em determinada área. Ademais, agências de fomento à pesquisa passaram a exigir a produção de revisões sistemáticas para assegurar que justificativa para pesquisa futuras (GOPALAKRISHNAN & GANESHKUMA, 2013). Nos últimos anos, tem sido observado um aumento de periódicos indo a essa direção, mas ainda é bastante baixo considerando a importância desse tipo de estudo (BOICE, 2019).

Revisões sistemáticas são importantes e necessárias nesse âmbito

pois são capazes de gerar evidências científicas através da análise sistemática da literatura disponível respondendo a uma pergunta de forma objetiva e imparcial (COOK et al., 2013; HODGKINSON & FORD, 2014), baseando-se em critérios pré-definidos para a seleção de estudos e para posteriores extração e análise dos resultados (RITSKES-HOITINGA, 2014). Embora a relevância das revisões sistemáticas seja evidente, ainda há uma considerável escassez em estudos dessa classificação (BOICE, 2019). Por essa razão, fica evidenciada a importância da utilização de revisões sistemáticas como um suporte para melhor compreender determinados processos biológicos, como a cicatrização da pele, ou mecanismo de ação de determinadas moléculas, como os miRNAs. Dessa maneira, ainda podem ser apoio para estudos futuros que busquem o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a problemática associada à cicatrização da pele.

4 MANUSCRITO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito. Os itens Metodologia, Resultados, Discussão e Referências encontram-se estruturados de acordo com as normas da revista “PLOS ONE” (fator de impacto: 3.240). O presente manuscrito encontra-se submetido a esta revista científica.

MicroRNAs expressed during wound healing and their associated pathways: a systematic
review and bioinformatics analysis
The role of microRNA in wound healing

MORGANA LÜDTKE AZEVEDO^{1¶#b}, ROBERTA GIORGI SILVEIRA^{2¶}, FERNANDA
NEDEL^{2&}, RAFAEL GUERRA LUND^{1&*#a}

¹ Graduated Program in Biochemistry and Bioprospecting, Federal University of Pelotas,
Pelotas, RS, Brazil

² Graduated Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, Pelotas, RS,
Brazil

^{#a}Current address: Graduated Program in Biochemistry and Bioprospecting, Federal
University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

^{#b}Current address: Graduated Program in Biochemistry and Bioprospecting, Federal
University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

*Corresponding author:

E-mail: rafael.lund@gmail.com (RGL)

¶These authors contributed equally to this work.

&These authors also contributed equally to this work.

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are responsible for regulating gene expression post-transcriptionally. Are involved in several biological processes, such as wound healing. Understanding the miRNAs involved in this process is fundamental for the development of new therapies. So, due to the need to understand the role of these molecules, we aimed systematically review the literature in order to identify which miRNAs are involved in the wound healing and determine, through bioinformatics analysis, which signaling pathways are associated with these miRNAs. An electronic search was performed in the following databases: National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed), Science Direct, Scifinder, Scopus and Web of Science, using the descriptors: “(microRNA [MeSH])” and “(skin [MeSH])” and “(wound healing [MeSH])”. After the search, two independent and previously calibrated reviewers selected the articles that analyzed the expression pattern of miRNAs in wound healing in *in vivo* studies, using the software Zotero bibliography manager. Following, bioinformatic analysis was performed using the software DIANA Tools, mirPath v.3 and the data was interpreted. The bioinformatics analysis revealed that on the day 1 there were 13 union pathways, eight of which were statistically significant. Still on the day 1, among the miRNAs that had a decrease in their expression, 12 of 17 union pathways found were statistically significant. On the day 5, among the miRNAs with an increased in expression, 16 union pathways were found, 12 of which were statistically significant. Finally, among the miRNAs with decreased expression, 11 of 15 union pathways found were statistically significant. Although it has been found a substantial heterogeneity of the studies, with this systematic review, it was possible to study the panorama of miRNAs that may be altered in the wound healing. The present review summarizes existing evidence of miRNAs associated to wound healing, and these findings can contribute to new therapeutic approaches.

Introduction

Wound healing is a biological process extremely complex able to recover the barrier function of skin. It requires a synchronization of several cell types beyond the interaction between cytokines and growth factors. It is composed of four different phases: hemostasis, inflammation, proliferation, and remodeling. Each one of these phases is important that the process can occur properly. However, during the proliferative phase occurs a cascade of events of major importance for the process as a whole, such as re-epithelization, angiogenesis, and wound closure [1].

The events associated to wound healing can be affected for a variety of agents, changing the wound bed environment. Excessive wound healing – hypertrophic scar and keloid – and chronic wound are some of the sequels of an impaired wound healing [2,3]. Indeed, this process is highly complex and consists of several steps, being more susceptible to fault. Since as the wound healing do not occurs normally, a chronic wound may be the most recurrent consequence [4]. Nowadays, the chronic non-healing wounds can affect millions of patients each year, resulting in higher morbidity and mortality of these patients [5]. Furthermore, the issue related to chronic wounds is not limited only to ulcers, but it is also associated to other challenges to be overcome, such as infectious and ischemic wounds. It is also known the treatment of chronic non-healing wounds remains a stretch goal on the subject of complexity and prevalence [6]. Considering this, it is clear the need for a therapeutic approach able of overcoming the problem of the complexity of this wound type in terms of treatment.

At the same time, several studies have reported miRNA as a potential therapeutic target for various diseases or conditions, from wound healing to cancer [7,8,9] MiRNAs are small non-coding RNA molecules of approximately 22 nucleotides and responsible for the regulation of gene expression at the post-transcriptional level [10,11]. They are involved in an assorted of biological processes, from embryonic development to main cell functions, such as

proliferation, differentiation, and apoptosis. The miRNA biogenesis and mechanism of action are known only about two decades ago and its molecular mechanism and is not yet totally elucidated [12,13]. The miRNA research is clearly expanding, mainly in the last five years, because increasingly more studies have elucidated some points of miRNA molecular mechanisms. Moreover, as the miRNAs are important regulators of gene expression, may be the promising targets for the development of biomarkers and it can help in the development of a therapy [14].

Although there are still some questions about miRNA to be clarified, it is currently known that it is a key part of the entire epigenetic machinery acting as an important regulator of gene expression [15]. The epigenetic plays an important role in all the processes that occurs in living organisms and can be used to explain several features of diseases and biological events, such as its pathway or late onset and end [16]. However, miRNAs are not only a part of epigenetic machinery, but are also can modified epigenetically by DNA methylation and histone modification just like other protein-coding gene [17,18]. These changes in the miRNA expression pattern occurs also during the wound healing, and as reported several miRNAs can be found decreased, including the members of miR-200 family [19] or increased like miR-31, miR-33 and miR-196, among others [20,21,22,23]. Also was reported that certain miRNAs, such as miR-21, can mitigate possible aging-associated wound healing failures [24].

Therefore, due to comprehension about the miRNAs role in wound healing, as well as where and how it acts, can be applied in identifying the pathways involved in the process in order to bring new possibilities of molecular target therapies to the defects that can occurs during wound healing. Further, considering the lack of studies about the panorama of miRNAs and theirs signaling pathways, mainly related to wound healing, we aimed to systematically review the available literature for the purpose of identify which miRNAs are associated to the wound healing phases and their associated pathways using bioinformatics analysis.

Material and methods

Registration and review questions

The current systematic review is reported in accordance with the Preferred Items for Systematic Review and Meta-Analysis (PRISMA) guidelines. Due to the study design's nature, the protocol was registered in the Open Science Framework and it available at the following link (<https://osf.io/xp4tf/>).

The review questions were: (1) Which miRNAs have been related with wound healing process? (2) In which pathways do these miRNAs act?

Inclusion and exclusion criteria

The inclusion criterion for the articles were *in vivo* animal studies that analyzed the miRNA expression patterns in the wound healing process. The choice to use only *in vivo* animal studies is due to the similarity found in the methodology of these studies, reducing possible confounding variables. Only studies published in English were included. The exclusion criteria were congress summary, book section, literature reviews, hypothesis articles, opinion articles, methodological approaches, commentaries, previews, expertise opinions, letters, news, patents, studies unrelated to miRNA and wound healing, and studies with confounding factors. Besides that, articles were not written in English and not fully available were also excluded.

Search strategy

The electronic strategy was carried out without date restriction in the following databases: PubMed, Science Direct, Scifinder, Scopus and Web of Science. In this case, the Google Scholar database was not used due to the fact that it presents low precision in recently established themes, such as miRNAs [25,26]. The search strategy was conducted using the

following terms: “(MicroRNAs) AND (Skin) AND (Wound Healing)”. No language was applied in the search.

Study selection

The search results have been exported to the Zotero bibliography manager. Initially, duplicate records were excluded. Titles, abstracts, and study methodologies were screened based on the inclusion and exclusion criteria by two blinded and independent reviewers (MLA and RGS). All records were compared and in case of disagreement, a consensus was reached by discussion. When consensus was not achieved, a different reviewer decided if the article should be included (RGL).

Data extraction

Data were extracted and tabulated independently by two reviewers (MLA and RGS) in an Excel spreadsheet (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) to be submitted to a descriptive analysis. Cases of disagreement were handled as described above.

Bioinformatics analysis

After extracting the data, the miRNAs that showed different expression patterns (higher or lower expression) and were repeated on the days 1 and 5 during the wound healing process were separately inserted, using the software DIANA Toll mirPath v.3. The inclusion criterion for bioinformatics analysis were the miRNAs that were described more than one time at different times analyzed in the selected studies, and the exclusion criterion were the miRNAs described just one time in the selected studies beyond the miRNAs do not indexed in mirPath v.3. So, the miRNAs that were not recognized by the software were disregarded in this analyse.

The analyses were performed in real-time using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genoma (KEGG) selecting the murine specie to investigate the miRNAs. The interactions dataset chosen for all miRNAs was TarBase v7.0 and in the advanced statistics options, False Discovery Rate (FDR) correction was chosen. The Fisher's Exact Test was used with a p-value threshold of 0.05. After inserting all miRNAs into the software, the pathway associated were observed and tabulated, specifying its p-value and its relationship to the wound healing process.

Quality assessment

To assess the quality of the studies included in this systematic review, the Review Manager 5.4.1 software was used. The checklist was composed of three domains: wound healing assay, miRNA analyze and presence of a control group (uninjured skin). Two independent researchers (MLA and RGS) assessed the quality of the studies based on criterion previously established. In case of disagreement were discussed until a consensus was reached, and when a consensus was not obtained, a third reviewer participated in the discussion (RGL).

Results

The initial search amounted to 3,227 records. After the removal of duplicates, a total of 2,370 articles remained for title and abstract screening. So, 915 articles remained for full text reading screening. After reading the full text, were excluded 847 articles, remained 68 articles that satisfying the inclusion criteria. These of 68 articles, 40 were excluded for not performing the analysis in *in vivo* animal. A total of 28 articles remained, and 16 of these ended up being excluded for shown possible confounding variables, such as studies that used some type of treatment or transgenic animal. In other words, studies that did not analyze the wound healing under regular conditions. Finally, remained 12 articles that presents viable data to analyze, as shown in the PRISMA flowchart for the study selection process (Fig 1).

Fig 1. Flow diagram of study selection.

Among the 12 selected studies, it is clear that the country of publication of the most recurrent articles is the USA, totaling 6 of the 12 articles, followed by China with 4 of these publications. Regarding the year of publication, the oldest article date from 2012, demonstrating how recent the miRNAs studies, especially in relation to wound healing, is recent. These results are also described and illustrated on the figure below (Fig 2).

Fig 2. Correlation between publication countries and years of selected articles.

Table 1 refers to the main methodologies used in the 12 selected articles. Concerning to the animal model used, the choice was unanimous. Absolutely all articles used mice as a model animal, there were a few studies that used rats; however, these ended up being excluded due to eligibility criteria. The most frequent strains were C57BL/6, C57BL/6J and Balb-C. Interestingly, the SKH-1 strain, which are hairless mice in skin, was reported in only one article. Almost half of the studies specified the gender of their animals – female (n=3) and male (n=4) – the other half did not specify. Most animals were between 8-10 weeks old. The more frequently methodology applied for the induction of the lesion was full thickness wound by biopsy punch in 100% of the articles. The recurrentest induction site of the lesion was on the dorsal skin, and the lesions sized between 3-6 mm.

Table 1. Correlation of the main methodological approaches found in the selected articles.

Author, Year	Animal conditions				Wound procedures		
	Animal	Strain	Sex	Age	Injury induction site	Injury type	Injury size
Aunin et al., 2017	Mice	-	-	8 weeks	Back skin	Full thickness wound by biopsy punch	3 mm
				2 years	Back skin	Full thickness wound by biopsy punch	3 mm
Chan et al., 2012a	Mice	C57BL/6	Male	8-10 weeks	Dorsal skin	2 or 4 full thickness excisional wound by biopsy punch	6 mm
Chan et al., 2012b	Mice	C57BL/6	Male	-	Dorsal skin	2 full thickness wound	8x16 mm
	Mice	C57BL/6	Male	-	Dorsal skin	2 or 4 full thickness excisional wound by biopsy punch	6 mm
Chen et al., 2019	Mice	Balb/c	Female	8-10 weeks	Dorsal skin	2 full thickness incisional wounds using a pair of scissors	10 mm
						2 full thickness excisional wounds by biopsy punch	5 mm
					Anterior of the hard palate	3 incisional wounds using a scalpel blade	50 mm
Etich et al., 2017	Mice	C57BL/6N	-	8-10 weeks	Back skin	Full thickness wounds by biopsy punch	6 mm
Jin et al., 2013	Mice	SKH-1	Female	8 weeks	Dorsal skin	2 full thickness wounds by biopsy punch	3.5 mm
Shi et al., 2018	Mice	-	-	7-8 weeks	Dorsal skin	Full thickness wounds by biopsy punch	6 mm
		K14-Cre					
Simões et al., 2019	Mice	Balb/c	Female	8-10 weeks	Dorsal skin	Full thickness wounds by biopsy punch	5mm
					Hard palate from maxilla	Full thickness with a pair of forceps	-
					Dorsal skin	2 full thickness excisional wounds by biopsy punch	5 mm
van Solingen et al., 2014	Mice	B6.Cg-Mirm155 ^{tm1.1Rsky} /J	-	10-12 weeks	-	2 full thickness by biopsy punch	6 mm
		C57BL	-	10-12 weeks	-	2 full thickness by biopsy punch	6 mm
Wang et al., 2012	Mice	C57BL	Male	Adult	Back	Full thickness skin excision	10 mm
Wang et al., 2019	Mice	C57BL (H-2b)	Male	Adult	Back	2 full thickness by biopsy punch	6 mm
		B6.Cg-Mirm155 ^{tm1.1Rsky} /J	Male	6-8 weeks	Back	2 full thickness by biopsy punch	6 mm
Zhao et al., 2020	Mice	C57BL/6J	-	8-12 weeks	Back	2 circular full thickness excisional wounds	6 mm
		C57BL/6J	-	8-12 weeks	Back	2 circular full thickness excisional wounds	6 mm
		-	Male and female	-	Back	2 circular full thickness excisional wounds	6 mm

Main findings regarding the methodological approaches of the studies including animal and strain, injury induction site, injury size and wound procedure.

As shown in the table 2, the main techniques used to analyze the expression of miRNA were RT-qPCR, reported by the most articles, and microarray. Some studies combined the two methodologies. The total amount of miRNA that had its expression analyzed varied according to the days of analysis. Among the most recurrent analysis times that were related to the wound healing phases, three days stood out: day 1, day 3 and day 5. However, the day 3 was analyzed by only one of the selected articles, so the bioinformatics analysis were performed according to the data obtained on the days 1 and 5.

Table 2. Correlation of results regarding the expression pattern of miRNAs at different times of analysis⁴³

Author, Year	Collection time	Technique	Increased microRNA expression.		Decreased microRNA expression		Not affected
Aunin et al., 2017	Day 3 [#]	RT-qPCR	miR-31		miR-200 ^a	miR-141	-
					miR-200b	miR-429	
					miR-200c		
		Microarray	mmu-miR-705	mmu-miR-669f-3p	mmu-miR-541-5p	mmu-miR-500-3p	mmu-miR146b-5p
			mmu-miR-346-3p	mmu-miR-466i-3p	mmu-miR-1894-3p	mmu-miR-467d-3p	mmu-miR-214-3p
			mmu-miR-1892	mmu-miR-466m-3p	mmu-miR-5119	mmu-miR-677-3p	mmu-miR-25-3p
			mmu-miR-31-5p	mmu-miR-669e-3p	mmu-miR-434-3p	mmu-miR-199a-5p	
					mmu-miR-127-3p	mmu-miR-222-3p	
					mmu-miR-200c-3p	mmu-miR-5121	
					mmu-miR-376b-3p	mmu-miR-22-3p	
					mmu-miR-3970	mmu-miR-5100	
					mmu-miR-411-5p	mmu-miR-26b-5p	
					mmu-miR-29b-3p	mmu-miR-3963	
					mmu-miR-379-5p	mmu-miR-221-3p	
					mmu-miR-329-3p	mmu-miR-25-3p	
					mmu-miR-335-5p	mmu-miR-150-5p	
	Day 5 [#]	RT-qPCR	miR-31		miR-200a	miR-141	-
					miR-200b	miR-429	
					miR-200c		
		Microarray	mmu-miR-5119	mmu-miR-335-5p	mmu-miR-541-5p	mmu-miR-500-3p	mmu-miR-705
			mmu-miR-376b-3p	mmu-miR-677-3p	mmu-miR-1894-3p	mmu-miR-199a-5p	mmu-miR-669f-3p
			mmu-miR-1892	mmu-miR-214-3p	mmu-miR-346-3p	mmu-miR-222-3p	mmu-miR-467d-3p
			mmu-miR-31-5p		mmu-miR-434-3p	mmu-miR-466m-3p	mmu-miR-466i-3p
					mmu-miR-127-3p	mmu-miR-669e-3p	mmu-miR-5100
					mmu-miR-200c-3p	mmu-miR-5121	
					mmu-miR-3970	mmu-miR-22-3p	
					mmu-miR-411-5p	mmu-miR-26b-5p	
					mmu-miR-29b-3p	mmu-miR-3963	
					mmu-miR-379-5p	mmu-miR-221-3p	
					mmu-miR146b-5p	mmu-miR-25-3p	
					mmu-miR-329-3p	mmu-miR-150-5p	
	Day 7 [#]	RT-qPCR	miR-200a	miR-429	miR-31	miR-200c	-
					miR-200b	miR-141	
	Day 3 ⁺	RT-qPCR	miR-200c		miR-31	miR-141	-
					miR-200a	miR-429	

		Microarray	mmu-miR-541-5p	mmu-miR-29b-3p	mmu-miR-411-5p	mmu-miR-466m-3p	mmu-miR-3970
			mmu-miR-705	mmu-miR146b-5p	mmu-miR-31-5p	mmu-miR-669e-3p	mmu-miR-329-3p
			mmu-miR-1894-3p	mmu-miR-500-3p	mmu-miR-379-5p	mmu-miR-5121	mmu-miR-199a-5p
			mmu-miR-5119	mmu-miR-677-3p	mmu-miR-335-5p	mmu-miR-22-3p	
			mmu-miR-346-3p	mmu-miR-222-3p	mmu-miR-669f-3p	mmu-miR-25-3p	
			mmu-miR-434-3p	mmu-miR-214-3p	mmu-miR-467d-3p	mmu-miR-150-5p	
			mmu-miR-127-3p	mmu-miR-5100	mmu-miR-466i-3p		
			mmu-miR-200c-3p	mmu-miR-26b-5p			
			mmu-miR-376b-3p	mmu-miR-3963			
			mmu-miR-1892	mmu-miR-221-3p			
	Day 5 ⁺	RT-qPCR	-		miR-31	miR-141	-
					miR-200a	miR-429	
					miR-200b		
					miR-200c		
		Microarray	mmu-miR-541-5p	mmu-miR-669f-3p	mmu-miR-1892		-
			mmu-miR-705	mmu-miR-467d-3p	mmu-miR-31-5p		
			mmu-miR-1894-3p	mmu-miR-677-3p	mmu-miR146b-5p		
			mmu-miR-5119	mmu-miR-199a-5p	mmu-miR-335-5p		
			mmu-miR-346-3p	mmu-miR-466i-3p	mmu-miR-222-3p		
			mmu-miR-434-3p	mmu-miR-466m-3p	mmu-miR-26b-5p		
			mmu-miR-127-3p	mmu-miR-214-3p	mmu-miR-3963		
			mmu-miR-376b-3p	mmu-miR-669e-3p	mmu-miR-221-3p		
			mmu-miR-3970	mmu-miR-5121	mmu-miR-200c-3p		
			mmu-miR-411-5p	mmu-miR-22-3p			
			mmu-miR-29b-3p	mmu-miR-5100			
			mmu-miR-379-5p	mmu-miR-25-3p			
			mmu-miR-329-3p	mmu-miR-150-5p			
			mmu-miR-500-3p				
	Day 7 ⁺	RT-qPCR	miR-31		miR-200a	miR-141	-
					miR-200b	miR-429	
					miR-200c		
Chan et al., 2012a	Day 3	RT-qPCR	-		miR-199a-5p		-
Chan et al., 2012b	Day 3	RT-qPCR	-		miR-200b		-
	Day 7	RT-qPCR	-		miR-200b		-
	Day 14	RT-qPCR	-		miR-200b		-
Chen et al., 2019	6 h	RT-qPCR	mmu-miR-10b-5p	mmu-miR-451a	mmu-miR-21-5p	mmu-miR-126a-5p	-
			mmu-miR-223-3p	mmu-miR-34c-5p	mmu-miR-31-5p	mmu-miR-199a-5p	

			mmu-miR-140-3p	mmu-miR-126a-3p	mmu-miR-48-24-2-5p					
			mmu-miR-99a-5p	mmu-miR-125b-5p						
			mmu-miR-26a-5p	mmu-miR-125a-5p						
	Day 1	RT-qPCR	mmu-miR-223-3p	mmu-miR-451a	mmu-miR-10b-5p	mmu-miR-126a-5p	-			
			mmu-miR-21-5p	mmu-miR-34c-5p	mmu-miR-99a-5p	mmu-miR-126a-3p				
			mmu-miR-140-3p		mmu-miR-26a-5p	mmu-miR199a-5p				
					mmu-miR-31-5p	mmu-miR-125b-5p				
					mmu-miR-24-2-5p	mmu-miR-125a-5p				
	Day 5	RT-qPCR	mmu-miR-233-3p	mmu-miR-451a	mmu-miR-10b-5p	mmu-miR-126a-3p	-			
			mmu-miR-21-5p	mmu-miR-34c-5p	mmu-miR26a-5p	mmu-miR-199b-3p				
			mmu-miR-140-3p	mmu-miR-199a-5p	mmu-miR-24-2-5p	mmu-miR-125b-5p				
			mmu-miR-99a-5p	mmu-miR-125a-5p	mmu-miR-126a-5p					
			mmu-miR-31-5p							
	Etich et al., 2017	Day 1	RT-qPCR	-		miR-204	miR-205	-		
		Day 5	RT-qPCR	miR-31		miR-204	miR-205	-		
		Day 7	RT-qPCR	miR-31		-		-		
Day 10		RT-qPCR	miR-31		-		-			
Day 14		RT-qPCR	miR-31		-		-			
Jin et al., 2013	Day 1	Microarray	mmu-miR-185	mmu-miR-139-5p	mmu-miR-152	mmu-miR-199a-5p	-			
			mmu-miR-151-5p	mmu-miR-1949	mmu-miR-365	mmu-miR-127				
			mmu-miR-423-5p	mmu-miR-486	mmu-miR-125a-5p	mmu-miR-183				
			mmu-miR-92a	mmu-miR-2861	mmu-let-7d*	mmu-miR-221				
			mmu-miR-92b	mmu-miR-2134	mmu-miR-181d	mmu-miR-151-3p				
			mmu-miR-714	mmu-miR-2135	mmu-miR-125b-5p	mmu-miR-689				
			mmu-miR-2137	mmu-miR-2133	mmu-miR-30c	mmu-miR-19b				
			mmu-miR-361	mmu-miR-705	mmu-miR-99a	mmu-miR-200b				
			mmu-miR-2141	mmu-miR-25	mmu-miR-100	mmu-miR-200c				
			mmu-miR-146b	mmu-miR-1894-3p	mmu-miR-182	mmu-miR-22				
			mmu-miR-2146	mmu-miR-652	mmu-miR-30d	mmu-miR-429				
			mmu-miR-2145	mmu-miR-15b	mmu-miR-146a	mmu-miR-320				
			mmu-miR-2138	mmu-miR-223	mmu-miR-1839-5p	mmu-miR-744				
			mmu-miR-132	mmu-miR-2138	mmu-miR-199b*	mmu-miR-690				
			mmu-miR-762		mmu-miR-128	mmu-miR-10b				
								mmu-miR-199a-3p	mmu-miR-98	-
								mmu-miR-1939	mmu-miR-10a	
	mmu-miR-214									
	miR-99a	miR-100								
	miR-99b									
	Day 5	Microarray	mmu-miR-152	mmu-miR-221	mmu-miR-365	mmu-miR-128				

			mmu-miR-714	mmu-miR-1949	mmu-miR-448-125a-5p	mmu-miR-132	
			mmu-miR-2137	mmu-miR-2861	mmu-miR-99a	mmu-miR-183	
			mmu-miR-199b*	mmu-miR-2134	mmu-let7d*	mmu-miR-139-5p	
			mmu-miR-2141	mmu-miR-689	mmu-miR-100	mmu-miR-151-3p	
			mmu-miR-199a-3p	mmu-miR-19b	mmu-miR-181d	mmu-miR-486	
			mmu-miR-1939	mmu-miR-22	mmu-miR-30c	mmu-miR-200b	
			mmu-miR-2146	mmu-miR-2135	mmu-miR-182	mmu-miR-200c	
			mmu-miR-214	mmu-miR-223	mmu-miR-185	mmu-miR-429	
			mmu-miR-2145	mmu-miR-2133	mmu-miR-30d	mmu-miR-320	
			mmu-miR-199a-5p	mmu-miR-705	mmu-miR-151-5p	mmu-miR-744	
			mmu-miR-2138	mmu-miR-690	mmu-miR-423-5p	mmu-miR-10b	
			mmu-miR-127	mmu-miR-1894-3p	mmu-miR-92a	mmu-miR-25	
			mmu-miR-762		mmu-miR-146a	mmu-miR-98	
					mmu-miR-365	mmu-miR-125b-5p	
					mmu-miR-92b	mmu-miR-10a	
					mmu-miR-361	mmu-miR-652	
					mmu-miR-1839-5p	mmu-miR-15b	
					mmu-miR-146b		
		RT-qPCR	-		-		miR-99a
							miR-99b
							miR-100
Shi et al., 2018	Day 1	RT-qPCR	miR-31		-		-
	Day 2	RT-qPCR	miR-31		-		-
	Day 3	RT-qPCR	miR-31		-		-
	Day 6	RT-qPCR	miR-31		-		-
	Day 8	RT-qPCR	miR-31		-		-
	Day 10	RT-qPCR	miR-31		-		-
	Day 12	RT-qPCR	-		miR-31		-
	Day 17	RT-qPCR	-		miR-31		-
Simões et al., 2019	6 h	Microarray	mmu-miR-378b	mmu-miR-99a-5p	mmu-miR-362-5p	mmu-miR-30c-2-3p	-
			mmu-miR-30a-5p	mmu-miR-532-5p	rno-miR-140-3p	mmu-miR-193b-5p	
			mmu-miR-21a-5p	mmu-miR-369-5p	mmu-miR-363-3p	cgr-miR-214-5p	
			mmu-miR-132-3p	mmu-miR-3470b-p5	mmu-miR-130b-5p	mmu-miR-10a-5p	
			mmu-miR-142a-5p	mmu-miR-133a-3p	mmu-miR-193b-3p	mmu-miR-10a-3p	
			mmu-miR-574-5p	hsa-miR-4448	mmu-miR-3068-5p	mmu-miR-674-5p	
			mmu-miR-148b-3p	mmu-miR-708-3p	mmu-miR-31-5p	chi-miR-99b-3p	
			mmu-miR-370-3p	mmu-miR-125b-1-3p	mmu-miR-667-3p	mmu-miR-107-3p	
			mmu-miR-503-5p	mmu-miR-5099	mmu-miR-425-3p	mmu-miR-574-3p	
			mmu-miR-223-5p	mmu-miR-615-3p	mmu-miR-361-3p	mmu-miR-24-2-5p	

mmu-miR-133a-5p	mmu-miR-340-3p	mmu-miR-477-26a-5p	mmu-miR-210-3p
mmu-miR-409-3p	mmu-miR-212-3p	mmu-miR-15b-3p	mmu-miR-484
mmu-miR-30e-3p	mmu-miR-192-5p	mmu-miR-152-5p	mmu-miR-15b-5p
mmu-miR-540-3p	mmu-miR-337-5p	mmu-miR-130b-3p	rno-miR-25-5p
mmu-miR-106b-3p	mmu-miR-673-5p	mmu-miR-125b-5p	mmu-miR-211-5p
cgr-miR-139-5p	mmu-miR-146b-3p	mmu-miR-181c-5p	mmu-miR-1247-5p
mmu-miR-1198-5p	mmu-miR-299b-3p	mmu-miR-669c-5p	mmu-miR-99a-3p
mmu-miR-7a-5p	mmu-miR-329-5p	mmu-miR-365-3p	mmu-miR-23b-3p
mmu-miR-1983	mmu-miR-1195	ptr-miR-203	mmu-miR-676-5p
mmu-miR-195a-5p	mmu-miR-329-3p	mmu-miR-30c-5p	mmu-miR-712-5p
mmu-miR-485-3p	mmu-miR-3068-3p	mmu-miR-203-3p	hsa-miR-7977
mmu-miR-223-3p	mmu-miR-340-5p	mmu-miR-872-3p	mmu-miR-342-3p
mmu-miR-335-3p	mmu-miR-328-3p	mmu-miR-10b-5p	mmu-miR-542-5p
mmu-miR-433-3p	mmu-miR-335-5p	rno-miR-214-3p	chi-miR-326-5p
mmu-miR-30a-3p	mmu-miR-132-5p	mdo-miR-26-5pC	mmu-miR-145a-5p
mmu-miR-34c-5p	mmu-miR-152-3p	mmu-miR-423-3p	mmu-miR-26a-2-3p
mmu-miR-298-5p	mmu-miR-434-5p	mdo-miR-26-5p	mmu-miR-425-5p
mmu-miR-379-3p	mmu-miR-351-5p	mmu-miR-199a-5p	oan-miR-1386
mmu-let-7g-5p	mmu-miR-379-5p	mmu-miR-200c-3p	mmu-miR-126a-3p
mmu-miR-3535	hsa-miR-4454	mmu-miR-3473d	mmu-miR-652-3p
mmu-miR-96-5p	mmu-miR-664-3p	mmu-miR-125a-5p	sha-miR-24
hsa-miR-411-3p	mmu-miR-665-3p	mmu-miR-181d-5p	mmu-miR-182-5p
mmu-miR-134-5p	mmu-miR-148b-5p	mmu-miR-98-3p	mmu-miR-1948-3p
mmu-miR-503-3p	mmu-miR-20a-5p	mmu-miR-221-3p	mmu-miR-8112
mmu-miR-351-3p	rno-miR-181a-2-3p		
mmu-miR-30d-5p	mmu-miR-221-5p		
mmu-miR-467b-5p	rno-miR-378a-5p		
mmu-miR-1a-3p	mmu-miR-3102-p3		
mmu-miR-323-3p	rno-miR-874-3p		
mmu-miR-541-5p	mmu-miR-1839-5p		
mmu-miR-494-3p	mmu-miR-3970		
mmu-miR-376b-3p	mmu-miR-495-3p		
mmu-miR-186-5p	mmu-miR-300-3p		
mmu-miR-212-5p	mmu-miR-28c		
rno-miR-25-3p	mmu-miR-224-5p		
mmu-miR-543-3p	mmu-miR-382-3p		
mmu-miR-204-5p	mmu-miR-222-3p		
mmu-miR-200a-3p	mmu-miR-582-3p		
cfa-miR-194	mmu-miR-496a-3p		

		mmu-miR-34b-3p	mmu-miR-409-5p	48	
		mmu-miR-450b-5p	mmu-miR-194-5p		
		mmu-mir-3470a-p3	mmu-miR-6538		
		mmu-miR-679-5p	bta-miR-378		
		cgr-miR-139-3p	mmu-miR-17-5p		
		mmu-miR-125a-3p	mmu-miR-144-3p		
		hsa-mir-4450-p3	mmu-miR-5126		
		mmu-miR-382-5p	mmu-miR-450a-5p		
		mmu-miR-877-5p	mmu-miR-467c-5p		
		mmu-miR-145a-3p	mmu-miR-378d		
		mmu-miR-1193-3p	mmu-miR-143-3p		
		mmu-miR-21a-3p	mmu-miR-23a-5p		
		hsa-miR-320b	mmu-miR-410-3p		
		mmu-miR-361-5p	mmu-miR-191-3p		
		mmu-miR-1a-1-5p	mmu-miR-222-5p		
		mdo-miR-22-3p	hsa-miR-1261		
		ptr-let-7i	mmu-miR-434-3p		
Day 1	Microarray	mmu-miR-362-5p	mmu-miR-125b-1-3p	mmu-miR-30a-5p	mmu-miR-329-5p
		mmu-miR-378b	mmu-miR-5099	mmu-miR-193b-3p	mdo-miR-26-5p
		mmu-miR-21a-5p	mmu-miR-340-3p	mmu-miR-133a-5p	mmu-miR-199a-5p
		rno-miR-140-3p	mmu-miR-212-3p	mmu-miR-30e-3p	mmu-miR-329-3p
		mmu-miR-132-3p	mmu-miR-192-5p	mmu-miR-31-5p	mmu-miR-3068-3p
		mmu-miR-142a-5p	mmu-miR-337-5p	mmu-miR-195a-5p	mmu-miR-125a-5p
		mmu-miR-574-5p	mmu-miR-146b-3p	mmu-miR-667-3p	mmu-miR-181d-5p
		mmu-miR-363-3p	mmu-miR-299b-3p	mmu-miR-335-3p	mmu-miR-98-3p
		mmu-miR-148b-3p	mmu-miR-423-3p	mmu-miR-30a-3p	mmu-miR-335-5p
		mmu-miR-370-3p	mmu-miR-1195	mmu-miR-379-3p	mmu-miR-30c-2-3p
		mmu-miR-503-5p	mmu-miR-200c-3p	mmu-miR-3535	mmu-miR-193b-5p
		mmu-miR-130b-5p	mmu-miR-3473d	mmu-miR-96-5p	cgr-miR-214-5p
		mmu-miR-223-5p	mmu-miR-340-5p	hsa-miR-411-3p	mmu-miR-10a-5p
		mmu-miR-409-3p	mmu-miR-328-3p	mmu-miR-30d-5p	mmu-miR-434-5p
		mmu-miR-540-3p	mmu-miR-221-3p	mmu-miR-1a-3p	mmu-miR-351-5p
		mmu-miR-106b-3p	mmu-miR-132-5p	mmu-miR-26a-5p	mmu-miR-664-3p
		cgr-miR-139-5p	mmu-miR-152-3p	mmu-miR-494-3p	mmu-miR-107-3p
		mmu-miR-3068-5p	mmu-miR-10a-3p	mmu-miR-376b-3p	mmu-miR-574-3p
		mmu-miR-1198-5p	mmu-miR-674-5p	mmu-miR-186-5p	mmu-miR-24-2-5p
		mmu-miR-7a-5p	chi-miR-99b-3p	mmu-miR-204-5p	mmu-miR-484
		mmu-miR-1983	mmu-miR-379-5p	mmu-miR-679-5p	mmu-miR-221-5p
		mmu-miR-485-3p	hsa-miR-4454	mmu-miR-152-5p	rno-miR-378a-5p

		mmu-miR-223-3p	mmu-miR-665-3p	mmu-miR-449-125b-5p	rno-miR-874-3p
		mmu-miR-425-3p	mmu-miR-148b-5p	mmu-miR-145a-3p	mmu-miR-211-5p
		mmu-miR-433-3p	mmu-miR-20a-5p	mmu-miR-1193-3p	mmu-miR-495-3p
		mmu-miR-34c-5p	rno-miR-181a-2-3p	mmu-miR-181c-5p	mmu-miR-99a-3p
		mmu-miR-298-5p	mmu-miR-210-3p	mmu-miR-365-3p	mmu-miR-23b-3p
		mmu-let-7g-5p	mmu-miR-15b-5p	mmu-miR-1a-1-5p	mmu-miR-676-5p
		mmu-miR-134-5p	mmu-mir-3102-p3	ptr-miR-203	mmu-miR-342-3p
		mmu-miR-503-3p	rno-miR-25-5p	mmu-miR-30c-5p	mmu-miR-409-5p
		mmu-miR-351-3p	mmu-miR-1839-5p	mmu-miR-99a-5p	mmu-miR-145a-5p
		mmu-miR-467b-5p	mmu-miR-3970	mmu-miR-203-3p	mmu-miR-26a-2-3p
		mmu-miR-323-3p	mmu-miR-1247-5p	mmu-miR-133a-3p	mmu-miR-126a-3p
		mmu-miR-361-3p	mmu-miR-300-3p	mmu-miR-872-3p	mmu-miR-143-3p
		mmu-miR-541-5p	mmu-miR-28c	mmu-miR-10b-5p	mmu-miR-410-3p
		mmu-miR-212-5p	mmu-miR-224-5p	mmu-miR-708-3p	sha-miR-24
		mmu-miR-15b-3p	mmu-miR-712-5p	rno-miR-214-3p	mmu-miR-182-5p
		rno-miR-25-3p	mmu-miR-382-3p	mdo-miR-26-5pC	mmu-miR-1948-3p
		mmu-miR-543-3p	mmu-miR-222-3p	mmu-miR-615-3p	mmu-miR-8112
		mmu-miR-200a-3p	hsa-miR-7977	mmu-miR-673-5p	mmu-miR-434-3p
		cfa-miR-194	mmu-miR-582-3p		
		mmu-miR-34b-3p	mmu-miR-496a-3p		
		mmu-miR-450b-5p	mmu-miR-194-5p		
		mmu-mir-3470a-3p	mmu-miR-6538		
		cgr-miR-139-3p	bta-miR-378		
		mmu-miR-125a-3p	mmu-miR-17-5p		
		hsa-mir-4450-p3	mmu-miR-542-5p		
		mmu-miR-382-5p	mmu-miR-144-3p		
		mmu-miR-877-5p	mmu-miR-5126		
		mmu-miR-130b-3p	mmu-miR-450a-5p		
		mmu-miR-669c-5p	chi-miR-326-5p		
		mmu-miR-21a-3p	mmu-miR-467c-5p		
		hsa-miR-320b	mmu-miR-378d		
		mmu-miR-361-5p	mmu-miR-425-5p		
		mdo-miR-22-3p	oan-miR-1386		
		ptr-let-7i	mmu-miR-23a-5p		
		mmu-miR-532-5p	mmu-miR-652-3p		
		mmu-miR-369-5p	mmu-miR-191-3p		
		mmu-mir-3470b-p5	mmu-miR-222-5p		
		hsa-miR-4448	hsa-miR-1261		
	Day 5	mmu-miR-362-5p	rno-miR-214-3p	mmu-miR-30a-5p	mdo-miR-26-5p

-

Microarray

mmu-miR-378b	mmu-miR-615-3p	mmu-miR-150-193b-3p	mmu-miR-3068-3p
mmu-miR-21a-5p	mmu-miR-340-3p	mmu-miR-133a-5p	mmu-miR-125a-5p
rno-miR-140-3p	mmu-miR-212-3p	mmu-miR-30e-3p	mmu-miR-328-3p
mmu-miR-132-3p	mmu-miR-337-5p	mmu-miR-195a-5p	mmu-miR-181d-5p
mmu-miR-142a-5p	mmu-miR-673-5p	mmu-miR-30a-3p	mmu-miR-30c-2-3p
mmu-miR-574-5p	mmu-miR-146b-3p	mmu-miR-3535	mmu-miR-193b-5p
mmu-miR-363-3p	mmu-miR-299b-3p	mmu-miR-96-5p	mmu-miR-10a-5p
mmu-miR-148b-3p	mmu-miR-329-5p	mmu-miR-30d-5p	mmu-miR-664-3p
mmu-miR-370-3p	mmu-miR-423-3p	mmu-miR-1a-3p	mmu-miR-107-3p
mmu-miR-503-5p	mmu-miR-1195	mmu-miR-26a-5p	mmu-miR-574-3p
mmu-miR-130b-5p	mmu-miR-199a-5p	mmu-miR-186-5p	rno-miR-181a-2-3p
mmu-miR-223-5p	mmu-miR-200c-3p	mmu-miR-204-5p	mmu-miR-24-2-5p
mmu-miR-409-3p	mmu-miR-329-3p	mmu-miR-200a-3p	mmu-miR-484
mmu-miR-540-3p	mmu-miR-3473d	mmu-miR-125b-5p	mmu-miR-221-5p
mmu-miR-106b-3p	mmu-miR-340-5p	mmu-miR-145a-3p	rno-miR-378a-5p
cgr-miR-139-5p	mmu-miR-98-3p	mmu-miR-181c-5p	mmu-miR-1839-5p
mmu-miR-3068-5p	mmu-miR-335-5p	hsa-miR-320b	mmu-miR-211-5p
mmu-miR-1198-5p	mmu-miR-221-3p	mmu-miR-365-3p	mmu-miR-99a-3p
mmu-miR-7a-5p	mmu-miR-132-5p	mmu-miR-1a-1-5p	mmu-miR-23b-3p
mmu-miR-1983	cgr-miR-214-5p	ptr-miR-203	mmu-miR-676-5p
mmu-miR-31-5p	mmu-miR-152-3p	mmu-miR-30c-5p	mmu-miR-145a-5p
mmu-miR-485-3p	mmu-miR-10a-3p	mmu-miR-99a-5p	mmu-miR-26a-2-3p
mmu-miR-223-3p	mmu-miR-674-5p	mmu-miR-203-3p	mmu-miR-378d
mmu-miR-667-3p	mmu-miR-434-5p	mmu-mir-3470b-p5	mmu-miR-143-3p
mmu-miR-425-3p	chi-miR-99b-3p	mmu-miR-133a-3p	mmu-miR-652-3p
mmu-miR-335-3p	mmu-miR-351-5p	mmu-miR-10b-5p	sha-miR-24
mmu-miR-433-3p	mmu-miR-379-5p	mmu-miR-708-3p	mmu-miR-182-5p
mmu-miR-34c-5p	hsa-miR-4454	mdo-miR-26-5pC	mmu-miR-8112
mmu-miR-298-5p	mmu-miR-665-3p	mmu-miR-192-5p	
mmu-miR-379-3p	mmu-miR-148b-5p		
mmu-let-7g-5p	mmu-miR-20a-5p		
hsa-miR-411-3p	mmu-miR-210-3p		
mmu-miR-134-5p	mmu-miR-15b-5p		
mmu-miR-503-3p	mmu-mir-3102-p3		
mmu-miR-351-3p	rno-miR-25-5p		
mmu-miR-467b-5p	rno-miR-874-3p		
mmu-miR-323-3p	mmu-miR-3970		
mmu-miR-361-3p	mmu-miR-495-3p		
mmu-miR-541-5p	mmu-miR-1247-5p		

			mmu-miR-494-3p	mmu-miR-300-3p	51		
			mmu-miR-376b-3p	mmu-miR-28c			
			mmu-miR-212-5p	mmu-miR-224-5p			
			mmu-miR-15b-3p	mmu-miR-712-5p			
			rno-miR-25-3p	mmu-miR-382-3p			
			mmu-miR-543-3p	mmu-miR-222-3p			
			cfa-miR-194	hsa-miR-7977			
			mmu-miR-34b-3p	mmu-miR-582-3p			
			mmu-miR-450b-5p	mmu-miR-342-3p			
			mmu-mir-3470a-p3	mmu-miR-496a-3p			
			mmu-miR-679-5p	mmu-miR-409-5p			
			cgr-miR-139-3p	mmu-miR-194-5p			
			mmu-miR-125a-3p	mmu-miR-6538			
			hsa-miR-4450-p3	bta-miR-378			
			mmu-miR-382-5p	mmu-miR-17-5p			
			mmu-miR-152-5p	mmu-miR-542-5p			
			mmu-miR-877-5p	mmu-miR-144-3p			
			mmu-miR-130b-3p	mmu-miR-5126			
			mmu-miR-1193-3p	mmu-miR-450a-5p			
			mmu-miR-669c-5p	chi-miR-326-5p			
			mmu-miR-21a-3p	mmu-miR-467c-5p			
			mmu-miR-361-5p	mmu-miR-425-5p			
			mdo-miR-22-3p	oan-miR-1386			
			ptr-let-7i	mmu-miR-126a-3p			
			mmu-miR-532-5p	mmu-miR-23a-5p			
			mmu-miR-369-5p	mmu-miR-410-3p			
			mmu-miR-872-3p	mmu-miR-222-5p			
			hsa-miR-4448	mmu-miR-1948-3p			
			mmu-miR-125b-1-3p	hsa-miR-1261			
			mmu-miR-5099	mmu-miR-434-3p			
van Solingen et al., 2014	Day 10	RT-qPCR	miR-155	miR-126	-		-
			miR-33				
Wang et al., 2012	Day 7	Microarray	hsa-miR-31	hsa-miR-29b	mmu-miR376c	mmu-miR-434-5p	-
			mmu-miR-712*	hsa-miR-373	hsa-miR-130a	hsa-miR-422b	
			mmu-miR-503	hsa-miR-203	hsa-miR-181a	hsa-miR-193b	
			mmu-miR-696	hsa-miR-18b	mmu-miR-434-3p	hsa-miR-30a-3p	
			hsa-miR-21	hsa-let-7f	hsa-miR-182	hsa-miR-181d	
			mmu-miR-712	hsa-miR19a	hsa-miR-181c	hsa-miR-497	
			hsa-miR-451	hsa-miR-130b	hsa-miR-127	mmu-miR-676	

			hsa-miR-296	hsa-miR-16	hsa-miR-96	rno-miR-429	
			mmu-mir-714	hsa-miR-572	hsa-miR-200b	*mmu-miR-133a	
			hsa-miR-223	hsa-miR-26b	hsa-miR-204	rno-miR-329	
			hsa-miR-142-5p	hsa-miR-17-3p	hsa-miR-30a-5p		
			hsa-miR-205	hsa-miR-365			
			mmu-miR-702	hsa-miR-125b			
			hsa-miR-612				
		RT-qPCR	miR-31	miR-203	miR-429	-	
			miR-21				
		Wang et al., 2019	Day 1	RT-qPCR	miR-155		
				miR-142			
Day 3	RT-qPCR		miR-196	miR-155	-	-	
			miR-142				
Day 7	RT-qPCR		miR-196	miR-155	-	miR-142	
Zhao et al., 2020	Day 3	RT-qPCR	-		miR-34a	-	
	Day 7	RT-qPCR	-		-	miR-34a	
	Day 14	RT-qPCR	-		-	miR-34a	

Main finding of the studies including collection time, miRNA expression technique, and miRNA expression (increased, decreased, or non-affected expression). The tabulated miRNA nomenclature was transcribed exactly as mentioned in the included studies.

Data referring to young mice (8-week-old).

+ Data referring to adult mice (2-year-old),

On the day 1, a total of 273 miRNAs was analyzed, and just two of these were not affected, in other words, do not have alteration in its expression pattern. Among these that showed some alteration in expression pattern, 153 miRNAs had an increase in its expression, while 118 miRNAs, decreased. On the day 5, the time of analysis with the highest amount of analyzed miRNA, the not affected ones totaled 5 miRNAs, while those with increased and decreased expression were 192 and 130, respectively. At last, considering these two days of analysis of the 12 selected articles, a total of 600 miRNAs had its expression pattern analyzed during the wound healing process. The most frequently found miRNAs on the days 1 and 5 that were analyzed by the bioinformatic are described in the table 4.

The bioinformatics analysis discloses that on the day 1, among the miRNAs that had their expression increased, there were three intersection pathways, but none with a statistically significant difference ($p \leq 0.05$) and 13 union pathways, eight of which were statistically significant. In the miRNAs that had a decrease in their expression, 17 union pathways were found, 12 of which were statistically significant, no one intersection pathway was found. On the day 5, in the miRNAs with an increased in expression, 16 union pathways were found, 12 of which were statistically significant, and also no one intersection pathway was found. Among the miRNAs with decreased expression, 15 union pathways were found, 11 of which were statistically significant, no one intersection pathway was found (Tables 3-6).

Table 3. Statistically significant union pathways referring to the miRNAs with increased expression on the day 1.

Pathway	p-value	Target genes
Fatty acid biosynthesis	<1e-325	2
Fatty acid metabolism	6.165574e-09	4
Steroid biosynthesis	6.921681e-08	3
Central carbon metabolism in cancer	2.532531e-05	9
Caffeine metabolism	2.639553e-05	2
Proteoglycans in cancer	0.009315449	8
Carbohydrate digestion and absorption	0.01156247	4
Fat digestion and absorption	0.01410009	2
Complement and coagulation cascades	0.04045149	7
Thyroid hormone and signaling pathway	0.04320222	11
HIF-1 signaling pathway	0.04440003	7
Renal cell carcinoma	0.04873515	7
Viral carcinogenesis	0.0496533	11

Table 4. Statistically significant union pathways referring to the miRNAs with decreased expression on the day 1.

Table 4. Statistically significant union pathways referring to the miRNAs with decreased expression on the day 1.

Pathway	p-value	Target genes
Prion diseases	6.72018e-13	7
Hippo signaling pathway	4.282252e-09	1
Proteoglycans in cancer	2.17414e-07	59
Caffeine metabolism	1.547323e-05	2
Renal cell carcinoma	9.472664e-05	17
Steroid biosynthesis	0.0001140205	5
Lysine degradation	0.00122778	18
Adherens junctions	0.001282294	20
TGF-beta signaling pathway	0.00177966	13
FoxO signaling pathway	0.003806427	47
Endocytosis	0.004723869	55
N-Glycan biosynthesis	0.0115209	15
Drug metabolism – other enzymes	0.01724572	6
Protein processing in endoplasmatic reticulum	0.0386971	55
Cicardian entrainment	0.04087073	1
Morphine addiction	0.04087073	1
Pancreatic cancer	0.04101645	23

Table 5. Statistically significant union pathways referring to the miRNAs with increased expression on the day 5.

Pathway	p-value	Target genes
Fatty acid biosynthesis	<1e-325	2
Fatty acid metabolism	4.440892e-16	11
Renal cell carcinoma	1.630683e-08	23
Steroid biosynthesis	3.491662e-07	5
TGF-beta signaling pathway	0.0001216682	13
Lysine degradation	0.0003168722	10
Thyroid hormone signaling pathway	0.0005841115	25
FoxO signaling pathway	0.0007019681	31
Central carbon metabolism in cancer	0.003639735	6
Proteoglycans in cancer	0.01120219	19
HIF-1 signaling pathway	0.01131124	17
Viral carcinogenesis	0.01320044	26
Bacterial invasion of epithelial cells	0.0176033	17
RNA degradation	0.0310473	10
Regulation of actin cytoskeleton	0.03361088	37
Axon guidance	0.04726244	25

Table 6. Statistically significant union pathways referring to the miRNAs with decreased expression on the day 5.

Pathway	p-value	Target genes
Hippo signaling pathway	2.384482e-11	1
Caffeine metabolism	8.713539e-08	2
Proteoglycans in cancer	7.888269e-06	32
Drug metabolism – other enzymes	0.0001989493	6
Steroid biosynthesis	0.0003114483	2
Circadian entrainment	0.0006915614	1
Morphine addiction	0.0006915614	1
Lysine degradation	0.001772916	12
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	0.00374839	4
Endocytosis	0.005002083	34
ErbB signaling pathway	0.008312138	18
MAPK signaling pathway	0.01457244	39
Phosphatidylinositol signaling system	0.01930813	16
Colorectal cancer	0.02517332	14
Protein processing in endoplasmic reticulum	0.04973187	29

Correlation of binding pathways observed in miRNAs with increased and decreased expression and their respective target genes.

The miRNAs and their associated pathways also are illustrated in the figure 3.

Fig 3. Heatmap of KEGG pathways referring to increased or decreased expression of miRNAs at different times of analysis.

Based on the quality assessment of the 12 studies, the three pre-established domains proved to be adequate (Fig 4). The requirement to perform the miRNA analyze in addition to the presence of a control group were the domains that presented insufficient or absent definitions according to pre-established domains.

Fig 4. Risk of bias of each included study in the domains: wound healing assay, miRNA analyze and presence of a control group.

Discussion

In this systematic review, based on the results obtained, can be observed a panorama of altered miRNAs during wound healing process and their pathways associated (Table 3).

Recent studies have often reported the importance of the role of miRNA in several cellular processes, including wound healing. These studies claim that during the process the miRNA expression pattern can alternate according to the day, suggesting its regulatory function in these cases [27,28,29]. In our results, it was possible to observe these patterns on different days of wound healing. on each of the days analyzed, essentially all the analyzed miRNAs suffered some alteration in their expression pattern. The miRNAs found with some alterations were quite varied, considering all analysis times.

On the day 1, among the miRNAs with an increased in their expression (mmu-miR-223-3p and mmu-miR-34c-5p), already it is possible to observe the correlation with wound healing. Evidence had shown that mmu-miR-223-3p is able to ameliorate vascular endothelial lesions through the IL6ST and STAT3 signaling pathways [23,30]. Furthermore, members of the miR-223 family have been associated as important regulators in the inflammatory process that occurs during early phases wound healing, which justifies its increase in expression on the day 1, when the inflammatory process of tissue repair occurs. Also, the miR-223 family has been shown to be effective in increasing the activation of neutrophils after episodes of bacterial infections, and consequently, improving the course of the healing process [31,32].

The miR-34 family also seems to be related to wound healing; it has been reported that several family members are up-regulated in epidermal keratinocytes during the wound healing. In addition, to being able to improve the inflammatory process occurring during healing due to release of inflammatory cytokines [33,34].

The miR-31 family is also closely related to the wound healing process, these miRNAs are able to regulate the keratinocytes proliferation, differentiation, and migration through regulation the signaling pathways NF- κ B, RAS/MAPK, Notch, and cytokines [35,36]. The miR-31-5p was found with expression decreased on the day 1 and increased on the day 5. Already described for its important role in cell migration, the miR-199a-5p was found decreased on the both days [37], but also there is evidence that miR-199a-5p can, in a negative way, regulate the angiogenic responses through responses by directly targeting ETS proto-oncogene 1 and transcription factor (Ets-1) [38]. The first miRNAs associated to inflammatory response were miR-132 and miR-125b, the expression was induced in a monocytic cell line treated with lipopolysaccharide [39,40,41]. However, the miR-125a-5p and miR-125b-5p were found with a decreased expression in both days. The angiogenesis also is regulated by the miRNAs. For instance, some studies already related the downregulation of miR-199a-5p expression in dermis and endothelial tissue during wound healing process. Also, through by targeting an angiogenesis-related transcription factor and its mediator, the miR-199a-5p can, negatively, regulated the angiogenic response of dermal microvascular endothelial cell in humans. In mice with homozygous deletions in the Ets-1 gene, was related an impaired of the angiogenesis, insufficient formation of granulation tissue and compromised wound closure. [42,43,41]. The miRNA-199a-5p was found with an expression decreased on the day 1, but do not on the day 5.

In our bioinformatics analysis, we investigated the associated pathways highlighting the statistically significant and related to wound healing. Among them, the thyroid hormone signaling pathway ($p = 0.04$) was identified. This pathway can be related to several biological processes by regulating gene expression. The thyroid hormone, for instance, already was described how one of the most potent simulators of growth and metabolic rate,

it has the ability to induce the angiogenesis through the increase of bGFG mRNA expression. via the integrin $\alpha v\beta 3$ /PKD/HDAC5 signaling pathway [44,45]. In culture of human keratinocytes, the exogenous thyroid human stimulated the expression of keratin genes, these genes are responsible for 30% of the protein of the epidermis, and there is clear evidence about the relation to keratin genes and wound healing specific phases [46]. Another representative pathway associated to miRNAs with an expression increased is the Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) signaling pathway ($p = 0.04$). Several studies already related the role of HIF-1 in wound healing, contributing to cell migration and division under hypoxic conditions, beyond the growth factor release and extracellular matrix [47,48].

The forkhead box O (FoxO) signaling pathway was also found among the miRNAs with an increased expression ($p = 0.0007$) targeting more than 30 genes. The FoxO family is constituted for transcription factors responsible for regulating genes expression in several cellular events and biological process, such as apoptosis, cell-cycle control, oxidative stress resistance and wound healing stimulation [49]. Also, the members of this family are recruited for keratinocyte mobilization and migration due to their ability to regulate, positively, transforming growth factor-beta (TGF- β 1) expression. The TGF- β 1 exerts effects on wound healing through the immune modulation, cell proliferation, migration and differentiation regulation and extracellular matrix production [50]. The TGF- β 1 signaling pathway was also found associated to wound healing ($p = 0.0001$). There are three isoforms (TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3) and all of these appears exert effects on wound healing through the SMAD pathway, mainly. The TGF- β 1 is more frequently related to the scarless wound healing formation, whereas the TGF- β 3 already was observed in fibrotic scarring [51]. These findings corroborate the TGF- β 1 decrease described in chronic non-healing wounds [52]. In general, the TGF- β family can play a role on the wound healing through inflammation regulation, fibroblast proliferation, angiogenesis simulation and deposition and remodeling of extracellular matrix [53].

Among the signaling pathways associated to the miRNAs with decreased expression and related to the wound healing process, was found the steroid biosynthesis pathway ($p =$

0.0001). This signaling pathway can be related to wound healing in many ways; the glucocorticoids (GC) are able to inhibit the wound healing through their membranous glucocorticoid receptor. This receptor via activation of Wnt-like 6 PLC/PKC signaling cascade interfere on the keratinocytes migration and, consequently, on the wound closure [54]. The Wnt signaling pathway already was, frequently, related to several aspects of skin development and physiology. Also, in cases of Wnt pathway reduction, the regenerative capacities and abilities are impaired. This pathway regulates the β -catenin activation, and this process appears to be one of the several inflammatory responses to injury [54,55]. Although, the Wnt signaling pathway in the inflammatory response is not yet very understood, some evidences, through the observation of gene Wnt5 increased expression in patients with severe sepsis, suggest β -catenin-independent Wnt signaling may be a proinflammatory stimulus, key event for the wound healing process [56].

Cell adhesion, mediated by adherens junctions, are crucial and closely related to wound healing process. The adherens junction signaling pathway ($p = 0.001$) plays an important role in the cell plasticity, providing a both cell-cell adhesion and fast cell-cell contact remodeling during several biological process, such as wound healing [57]. The adherens junctions are also a key target of endocytosis during wound healing; the endocytosis signaling pathway ($p = 0.004$), also found in miRNAs with decreased expression, provide the endocytic remodeling of adherens junctions. This cell adhesion is required to control the actin assembly on the wound edge increasing the speed of wound closure [58]. There are some evidences suggesting the most cell-cell adhesion proteins can be modified by N-Glycans, increasing the probability of the occurrence of defects in the formation on the protective barrier and in cell differentiation and adhesion. [59]. The N-Glycans biosynthesis signaling pathway ($p = 0.01$), and these glycans are clearly involved in processes responsible for regulating the terminal differentiation products in keratinocytes [60].

In addition, were identified two signaling pathways among the miRNAs with decreased expression involving the protein kinase. The ErbB (epidermal growth factor receptor) signaling pathway ($p = 0.08$) is a family of receptor tyrosine kinases (RTKs) responsible for

binding extracellular growth factor to intracellular pathways, so as to regulate some biological responses – cell proliferation, differentiation, and motility [61]. These growth factors, acting via RTKs, are able to control different cell types in skin wound healing, particularly macrophages and neutrophils. For this reason, the aberrant expression of the growth factors or their receptors is related to difficult wound healing [62]. The cell proliferation is also regulated for the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway ($p = 0.01$). Through more than 18 target genes, the activation of the MAPK pathway, mainly the extracellular signal-regulated kinase (ERK), is the most important regulator of several cell types migration. The ERK/MAPK pathway can be activated by skin damage and this activation has a strong effect on keratinocyte migration [63,64].

Ultimately, this systematic review has limitations that need to be highlighted. Different strains of mice were used to observe the miRNA pattern expression during wound healing, although there are certain strains most frequently used, their differences must be considered so that the results are properly interpreted. In different strains, beside the miRNA pattern expression, the signaling pathways also can be altered [65]. Another variable that can induce confusion and doubts is the analysis time. The wound healing is a complex and extensive process, in other words, does not occur in a fixed time, but in three or four phases taking to days to months [1,3]. Thus, it is necessary to define the most adequate analysis time to obtain the most reliable data possible, according to the studied species and the biological processes that the objective is to study. Nonetheless, in some cases, such heterogeneity may be important, for example, in order to identify new pathways that would not be related otherwise.

Hence, the results found in this systematic review and in bioinformatics analysis contribute to the identification of miRNAs altered during the wound healing process, as well as the associated signaling pathways. Furthermore, they can be used as a study tool for next works that aim to relate miRNAs to wound healing, in the search for new potential biomarker targets, whether for diagnosis or therapy.

Conclusion

In conclusion, the results of our systematic review demonstrated that some miRNAs are altered during the wound healing process. The bioinformatics analysis revealed that on the day 1, among the miRNAs with increased and decreased expression, there are 20 union pathways were statistically significant. And on the day 5, we can observe a similar amount, totalizing 23 union pathways statistically significant. The most miRNAs identified in our study play a role on the wound healing through regulating, mainly, the cell proliferation and differentiation, by several signaling pathways. It is worth noting the limitation we found in the selected studies regarding their significant heterogeneity, which can be explained by the differences in the target populations - in this case, the wound healing is observed in different strains of mice -, and timing of outcome measurements. In this sense, even though there is a diversity in the studies found, this heterogeneity can be important in order to identify new pathways that would probably not be considered in another manner, as in studies with low heterogeneity. But even then, the results we present help to better understand the complex network of miRNAs, as well as their role in the healing of wounds. With this systematic review, it was possible to study the panorama of miRNAs that may be altered in the wound healing, understanding which miRNAs and its respective signaling pathways may be involved in the wound healing process. The present review summarizes existing evidence of miRNAs associated to wound healing, and these findings can contribute to new therapeutic approaches.

Acknowledgements

The authors thank the financial support from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

1. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound healing: a cellular perspective. *Physiol Rev.* 2019;99: 665-706.

2. Basu S, Shukla V. Complications of wound healing. In: Measurements in wound healing. Springer. 2012: 109-144.
3. Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC. Wound healing. J Chin Med Assoc. 2017;20: 1-8.
4. Han G, Ceilley R. Chronic wound healing: a review of current management and treatments. Adv Ther. 2017;34: 599-610.
5. Yao Z, Niu J, Cheng B. Prevalence of chronic skin wounds and their risk factors in an inpatient hospital setting in northern China. Adv Wound Care. 2020;33: 1-10.
6. Gupta S, Andersen C, Black J, de Leon J, Fife C, John CL, et al. Management of Chronic Wounds: Diagnosis, Preparation, Treatment, and Follow-up. Wounds. 2017;29: 19-36.
7. Christopher AF, Kaur RP, Kaur G, Kaur A, Gupta V, Bansal P. MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. Perspect Clin Res. 2016;7: 68.
8. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. Nat Rev Drug Discov. 2017;16: 203-222.
9. Soliman AM, Das S, Abd Ghafar N, Teoh SL. Role of microRNA in proliferation phase of wound healing. Front genet. 2018;9: 38.
10. Hanna J, Hossain GS, Kocerha J. The potential for microRNA therapeutics and clinical research. Front genet. 2019;10: 478.
11. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. Int J Mol Sci. 2016;17: 1712.
12. Creugny A, Fender A, Pfeffer S. Regulation of primary micro RNA processing. FEBS Lett. 2018;592: 1980-1996.
13. Macgregor-Das AM, Das S. A microRNA's journey to the center of the mitochondria. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2018;315: 206-215.
14. Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. J Allergy Clin Immunol. 2018;141: 1202-1207.
15. Piletič K, Kunej T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. Arch Toxicol. 2016;90: 2405-2419.

16. Yao Q, Chen Y, Zhou X. The roles of microRNAs in epigenetic regulation. *Curr Opin Chem Biol.* 2019;51: 11-17.
17. Cui J, Zhou B, Ross SA, Zempleni J. Nutrition, microRNAs, and human health. *Adv Nutr.* 2017;8: 105-112.
18. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol.* 2019;234: 5451-5465.
19. Aunin E, Broadley D, Ahmed MI, Mardaryev AN, Botchkareva NV. Exploring a role for regulatory miRNAs in wound healing during ageing: involvement of miR-200c in wound repair. *Sci Rep.* 2017;7: 1-10.
20. Chan YC, Roy S, Huang Y, Khanna S, Sem CK. The microRNA miR-199a-5p down-regulation switches on wound angiogenesis by derepressing the v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1-matrix metalloproteinase-1 pathway. *J Biol Chem.* 2012;287: 41032-41043.
21. Etich J, Bergmeier V, Pitzler L, Brachvogel B. Identification of a reference gene for the quantification of mRNA and miRNA expression during skin wound healing. *Connect Tissue Res.* 2017;58: 196-207.
22. Shi J, Ma X, Su Y, Song Y, Tian Y, Yuan S, et al. MiR-31 mediates inflammatory signaling to promote re-epithelialization during skin wound healing. *J Investig Dermatol.* 2018; 138: 2253-2263.
23. Wang CR, Zhu HF, Zhu Y. Knockout of microRNA-155 ameliorates the Th17/Th9 immune response and promotes wound healing. *Curr Med Sci.* 2019;39: 954-964.
24. Long S, Zhao N, Ge L, Wang G, Ran X, Wang J, et al. MiR-21 ameliorates age-associated skin wound healing defects in mice. *J Genet Med.* 2018;20: 3022.
25. Boeker M, Vach W, Motschall E. Google Scholar as replacement for systematic literature searches: good relative recall and precision are not enough. *BMC Med Res Methodol.* 2013;13: 1-12.

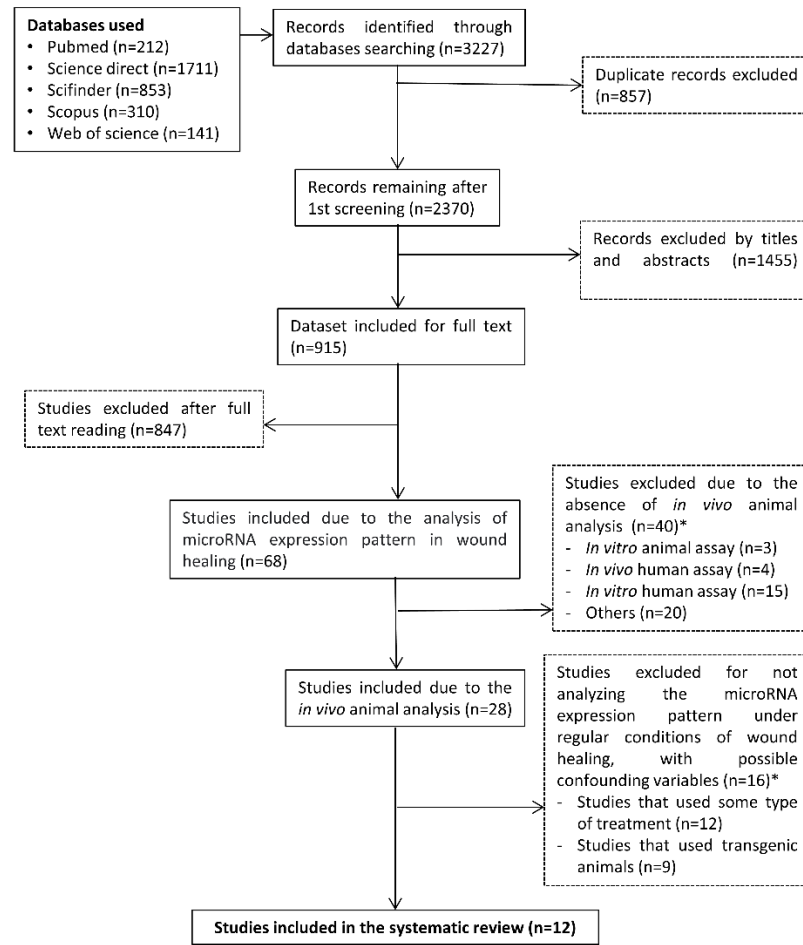
26. Silveira RG, Ferrúa CP, do Amaral CC, Garcia TF, de Souza KB, Nedel, F. MicroRNAs expressed in neuronal differentiation and their associated pathways: systematic review and bioinformatics analysis. *Brain Res Bull.* 2020;157: 140-148.
27. Wang W, Yang C, Wang X, yan Zhou L, Juan Lao G, Liu D, et al. MicroRNA-129 and-335 promote diabetic wound healing by inhibiting Sp1-mediated MMP-9 expression. *Diabetes.* 2018;67: 1627-1638.
28. Jiang Z, Wei J, Yang W, Li W, Liu F, Yan X, et al. MicroRNA-26a inhibits wound healing through decreased keratinocytes migration by regulating ITGA5 through PI3K/AKT signaling pathway. *Biosci Rep.* 2020;40: BSR20201361.
29. Wu Y, Zhang K, Liu R, Zhang H, Chen D, Yu S, et al. MicroRNA-21-3p accelerates diabetic wound healing in mice by downregulating SPRY1. *Aging.* 2020;12: 15436.
30. Zanoaga O, Braicu C, Chiroi P, Andreea N, Hajjar NA, Mărgărit S, et al. The Role of miR-155 in Nutrition: Modulating Cancer-Associated Inflammation. *Nutrients.* 2012;13(7): 2245.
31. Wolska-Gawron K, Bartosińska J, Rusek M, Kowal M, Raczkiewicz D, Krasowska D. Circulating miRNA-181b-5p, miRNA-223-3p, miRNA-210-3p, let 7i-5p, miRNA-21-5p and miRNA-29a-3p in patients with localized scleroderma as potential biomarkers. *Sci Rep.* 2020;10: 1-14.
32. Córdova-Rivas S, Fraire-Soto I, Mercado-Casas Torres A, Servín-González LS, Granados-López AJ, López-Hernández Y, et al. 5p and 3p strands of miR-34 family members have differential effects in cell proliferation, migration, and invasion in cervical cancer cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20: 545.
33. Wu J, Li X, Li D, Ren X, Li Y, Herter EK, et al. MicroRNA-34 family enhances wound inflammation by targeting LGR4. *J Investig Dermatol.* 2020;140: 465-476.
34. Childs DR, Murthy AS. Overview of wound healing and management. *Surgical Clinics.* 2017;97: 189-207.

35. Chen L, Simões A, Chen Z, Zhao Y, Wu X, Dai Y, et al. Overexpression of the oral mucosa-specific microRNA-31 promotes skin wound closure. *Int J Mol Sci.* 2019;20: 3679.
36. Wang F, Gao Y, Yuan Y, Du R, Li P, Liu F, et al. MicroRNA-31 Can Positively Regulate the Proliferation, Differentiation and Migration of Keratinocytes. *Biomed Hub.* 2020;5(2): 1-12.
37. Yan S, Xu Z, Lou F, Zhang L, Ke F, et al. NF- κ B-induced microRNA-31 promotes epidermal hyperplasia by repressing protein phosphatase 6 in psoriasis. *Nat Commun.* 2015;6(1): 1-15.
38. Gheinani AH, Burkhard FC, Rehrauer H, Fournier CA, Monastyrskaya K. MicroRNA MiR-199a-5p regulates smooth muscle cell proliferation and morphology by targeting WNT2 signaling pathway. *J Biol Chem.* 2015;290(11): 7067-7086.
39. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *PNAS.* 2006;103(33): 12481-12486.
40. Herter EK, Xu Landén N. Non-coding RNAs: new players in skin wound healing. *Adv Wound Care.* 2017;6(3):93-107.
41. Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immun.* 2007;179(8):5082-5089.
42. Veith AP, Henderson K, Spencer A, Sligar AD, Baker AB. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019;146: 97-125.
43. Chan YC, Khanna S, Roy S, Sen CK. miR-200b targets Ets-1 and is down-regulated by hypoxia to induce angiogenic response of endothelial cells. *J Biol Chem.* 2011;286(3): 2047-2056.
44. Safer JD. Thyroid hormone and wound healing. *J Thyroid Res.* 2013;2013: 124538.

45. Liu X, Zheng N, Shi YN, Yuan J, Li L. Thyroid hormone induced angiogenesis through the integrin $\alpha v\beta 3$ /protein kinase D/histone deacetylase 5 signaling pathway. *J Mol Endocrinol*. 2014;52(3): 245-254.
46. Losner J, Courtemanche K, Whited JL. A cross-species analysis of systemic mediators of repair and complex tissue regeneration. *Npj Regen Med*. 2012;6(1): 1-11.
47. Hong WX, Hu MS, Esquivel M, Liang GY, Rennert RC, McArdle A, et al. The role of hypoxia-inducible factor in wound healing. *Adv Wound Care*. 2014;3(5): 390-399.
48. Xu J, Liu X, Zhao F, Zhang Y, Wang Z. HIF1 α overexpression enhances diabetic wound closure in high glucose and low oxygen conditions by promoting adipose-derived stem cell paracrine function and survival. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1): 1-13.
49. Rajendran NK, Kumar SSD, Houreld NN, Abrahamse H. Understanding the perspectives of forkhead transcription factors in delayed wound healing. *J Cell Commun Signal*. 2019;13(2): 151-162.
50. Walton KL, Johnson KE, Harrison CA. Targeting TGF- β mediated SMAD signaling for the prevention of fibrosis. *Front Pharmacol*. 2017;8: 461.
51. Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burn Trauma*. 2012;2(1): 18.
52. Liarte S, Bernabé-García Á, Nicolás FJ. Role of TGF- β in skin chronic wounds: a keratinocyte perspective. *Cells*. 2020;9(2): 306.
53. Zhang T, Wang XF, Wang ZC, Lou D, Fang QQ, Hu YY, et al. Current potential therapeutic strategies targeting the TGF- β /Smad signaling pathway to attenuate keloid and hypertrophic scar formation. *Biomed Pharmacother*. 2020;129: 110287.
54. Jozic I, Vukelic S, Stojadinovic O, Liang L, Ramirez HA, Pastar I, et al. Stress signals, mediated by membranous glucocorticoid receptor, activate PLC/PKC/GSK-3 β / β -catenin pathway to inhibit wound closure. *J Invest Dermatol*. 2017;137(5): 1144-1154.
55. Slominski AT, Zmijewski MA. Glucocorticoids inhibit wound healing: novel mechanism of action. *J Invest Dermatol*. 2017;137(5): 1012-1014.

56. Ackers I, Malgor R. Interrelationship of canonical and non-canonical Wnt signalling pathways in chronic metabolic diseases. *Diab Vasc Dis Res.* 2018;15(1): 3-13.
57. Shi J, Barakat M, Chen D, Chen L. Bicellular tight junctions and wound healing. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2): 3862.
58. Matsubayashi Y, Coulson-Gilmer C, Millard TH. Endocytosis-dependent coordination of multiple actin regulators is required for wound healing. *Int J Cell Biol.* 2015;210(3): 419-433.
59. Dabelsteen S, Pallesen EM, Marinova IN, Nielsen MI, Adamopoulou M, Rømer TB, et al. Essential functions of glycans in human epithelia dissected by a CRISPR-Cas9-engineered human organotypic skin model. *Dev Cell.* 2020;54(5): 669-684.
60. Jin SP, Chung JH. Inhibition of N-glycosylation by tunicamycin attenuates cell–cell adhesion via impaired desmosome formation in normal human epidermal keratinocytes. *Biosci Rep.* 2018;38(6): BSR20171641.
61. Sabbah DA, Hajjo R, Sweidan K. Review on epidermal growth factor receptor (EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors. *Curr Top Med Chem.* 2020;20(10).
62. Kazanietz MG, Barrio-Real L, Casado-Medrano V, Baker MJ, Lopez-Haber C. The P-Rex1/Rac signaling pathway as a point of convergence for HER/ErbB receptor and GPCR responses. *Small GTPases.* 2018;94(2): 297-303.
63. Zhang L, Xu P, Wang X, Zhang M, Yan Y, Chen Y, et al. Activin B regulates adipose-derived mesenchymal stem cells to promote skin wound healing via activation of the MAPK signaling pathway. *Int J Biochem.* 2017;87: 69-76.
64. Lee S, Kim MS, Jung SJ, Kim D, Park HJ, Cho, D. ERK activating peptide, AES16-2M promotes wound healing through accelerating migration of keratinocytes. *Sci Rep.* 2018;8(1): 1-10.
65. Bleul T, Zhuang X, Hildebrand A, Lange C, Böhringer D, Schlunck G, et al. Different innate immune responses in BALB/c and C57BL/6 strains following corneal transplantation. *J Innate Immun.* 2021;13(1): 49-59.

Figures



* A study could have fulfilled more than one criterion

Fig 1. Flow diagram of study selection.



Fig 2. Correlation between publication countries and years of selected articles.

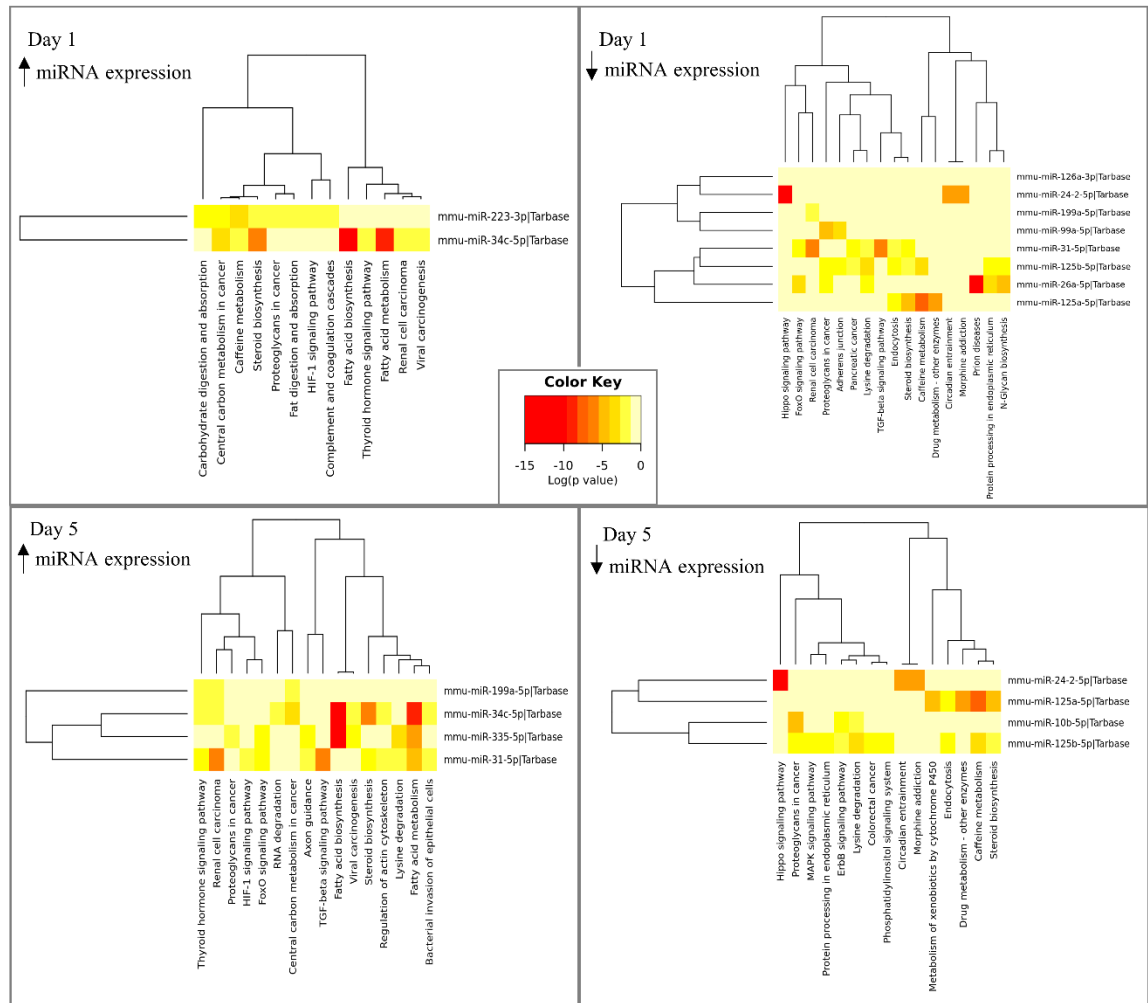


Fig 3. Heatmap of KEGG pathways referring to increased or decreased expression of miRNAs at different times of analysis.

	Low Risk		
	High Risk		
	Unclear information		
	Wound healing assay	MiRNA analyze	Presence of a control group (uninjured skin)
Aunin et al., 2017			
Chan et al., 2012a			
Chan et al., 2012b			
Chen et al., 2019			
Etich et al., 2017			
Jin et al., 2013			
Shi et al., 2018			
Simões et al., 2019			
van Solingen et al., 2014			
Wang et al., 2012			
Wang et al., 2019			
Zhao et al., 2020			

Fig 4. Risk of bias of each included study in the domains: wound healing assay, miRNA analyze and presence of a control group.

5 Discussão

Com base nos resultados obtidos nesta revisão sistemática, os miRNAs encontrados associados à cicatrização da pele foram agrupados na Tabela 2. O número de miRNAs avaliados variou de acordo com os dias de análise. Dentre estes, os mais frequentemente encontrados nos estudos selecionados foram os dias 1, 3 e 5. Estes são estágios muito importantes que ocorrem durante a cicatrização da pele de murinos (DUNN et al., 2013), modelo animal, consonantemente, descrito pelos estudos selecionados, e o mais comumente utilizado na experimentação científica (JACKSON et al., 2016). No dia 1, foram descritos 273 miRNAs, e apenas dois não apresentaram alteração no seu padrão de expressão. Já no dia 3, 69 miRNAs tiveram este padrão alterado, ora pelo aumento, ora diminuição da expressão. Entretanto, é válido ressaltar que embora o terceiro dia seja relevante para o processo de cicatrização da pele, ele é descrito por apenas um dos artigos selecionados. Por fim, no dia 5, dos 327 miRNAs descritos, 325 apresentaram tal alteração. O dia 1 corresponde ao início da fase inflamatória, a qual é caracterizada, principalmente, pela presença de infiltrado inflamatório no sítio da lesão. Também é neste período que há ativação e liberação de mediadores químicos, podendo haver edemas (COSTA et al., 2009; WONG et al., 2010; MASSON-MEYERS et al., 2020). No dia 3, inicia-se o processo de reepitelização, e podem ser observados alguns reflexos do primeiro dia: o fator XIII da coagulação, ativado no dia 1, estabiliza a fibrina e estimula a proliferação de fibroblastos, promovendo a migração deste tipo celular no coágulo de fibrina (COSTA et al., 2009; WOSGRAU et al., 2015). O quinto dia é marcado pela diminuição dos níveis de infiltrado inflamatório e pela invaginação epitelial do tecido conjuntivo (COSTA et al., 2009).

Os animais utilizados pelos estudos selecionados apresentavam idade média de 8-10 semanas, número semelhante à idade em que o modelo animal murino é, geralmente, utilizado, de 8-12 semanas (JACKSON et al., 2016). A idade é um fator relevante para o desenho experimental do estudo e uma das inúmeras condições que podem dificultar a cicatrização da pele, como ocorre no caso de feridas crônicas, mais comum em indivíduos de idade mais avançada (JACKSON et al., 2016; AUNIN et al., 2017). Em murinos, embora o envelhecimento seja incessante, ele é, geralmente, considerado uma variável

discreta, ao invés de contínua. Por esta razão, a maioria dos estudos consideram e concentram-se em duas, às vezes, três fases específicas da vida: adulto maduro (3-6 meses de idade), meia-idade (10-15 meses de idade) e velhice (18-24 meses de idade) (NADON et al., 2016).

Conforme descrito, a idade média encontrada nos artigos selecionados foi de 8-10 semanas, ou seja, a idade correspondente ao grupo de adultos maduros, o qual é representado por camundongos de 3-6 meses de idade (LEE et al., 2017). Neste grupo, os camundongos ainda não apresentam quaisquer processos biológicos afetados pela senescência. Por essa razão, o grupo de adultos maduros é a referência para quaisquer alterações no organismo decorrentes da mudança de idade, seja mudança maturacional ou senescente. Após os seis meses, os camundongos podem apresentar algumas alterações no funcionamento de seu organismo relacionadas à idade (JACKSON et al., 2016). A idade mínima – de 2-3 meses – também é fundamental, já que embora os camundongos estejam sexualmente maduros a partir de 30-35 dias, o desenvolvimento maturacional continua refletindo na maioria das estruturas biológicas e, principalmente, em alguns processos, como a cicatrização da pele, até os três meses, pelo menos (DUNN et al., 2013).

As lesões nos animais foram induzidas por biópsia por punção, em sua maioria. Este procedimento consiste na retirada de um pequeno pedaço do tecido ao qual pretende-se analisar utilizando um instrumento semelhante a uma caneta, onde no seu interior contém uma lâmina circular, pontiaguda e oca (SHIMBO et al., 2020). O instrumento deve ser posicionado no local pretendido da lesão, e então movimentos circulares e constantes devem ser feitos até que a lâmina corte completamente a epiderme e a derme (BRESLAVETS & LAPA, 2019). A biópsia por punção permite a remoção completa da pele, além de propiciar uma amostra de tecido intacta e íntegra (BRUBAKER et al., 2015), o que corrobora a sua frequência nos estudos selecionados. O tamanho médio da lesão encontrado foi de 6 mm, e as lesões eram feitas, geralmente, na pele dorsal do animal. O tamanho pode ser justificado pelo comprimento médio dos camundongos, de 12-20 cm, incluindo a cauda (JACKSON et al., 2016). A frequência da pele dorsal como sítio de indução da lesão mais recorrente, além de ser justificada pelo tamanho do animal, também é legitimada por ser um sítio-alvo recorrente em análises com diferentes propósitos, propiciando inúmeras possibilidades de análises para a pesquisa biomédica, tais como a cicatrização da pele (SORG et al., 2007; MACHADO et al., 2011), a angiogênese e revascularização (LINDENBLATT et al., 2008) e o desenvolvimento do câncer (MICHAEL et al., 2013).

As técnicas mais frequentemente descritas utilizadas na análise do padrão de expressão do miRNA foram microarranjo e RT-qPCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real). Os níveis de expressão do miRNA podem ser analisados por diferentes métodos, como as técnicas de hibridização *in situ* e *Nothern blotting* (RODEN et al., 2015). Mas de fato, as mais utilizadas correspondem as que foram encontradas nos estudos selecionados. Em ambas as técnicas, a repetibilidade é suficientemente alta, o que as torna os métodos mais adequados para estudar a expressão gênica (CAMARILLO et al., 2011; RODEN et al., 2015). Entretanto, cada metodologia apresenta vantagens e desvantagens específicas para cada tipo de análise. A técnica de microarranjo possibilita o rastreamento de inúmeros genes em uma única etapa, o que favorece a análise de um panorama geral de todos os transcritos analisados, mas apresenta limitação quanto à especificidade na detecção (ALONSO-BETANZOS et al., 2019). Enquanto a técnica de RT-qPCR apresenta uma maior sensibilidade, além de ser mais específica por permitir uma quantificação da expressão de miRNAs na amostra, entretanto, além de ocorrer em mais de uma etapa, tornando-a mais vagarosa, requer cerca de 1000 vezes menos transcritos em comparação à técnica de microarranjo (FORERO et al., 2019).

A análise bioinformática foi realizada sob os miRNAs mais recorrentes entre os estudos selecionados nos dias 1 e 5. No primeiro dia, dentre os miRNAs que apresentaram um aumento em sua expressão, dois deles são tidos como os mais frequentemente descritos (mmu-miR-223-3p e mmu-miR-34c-5p). Estes miRNAs apresentam diversas vias de sinalização em comum, algumas estritamente relacionadas ao processo de cicatrização da pele, tais como a via de ativação do sistema complemento e cascatas de coagulação. A via responsável pela ativação do sistema complemento tem um papel fundamental na inflamação, a qual é uma das principais fases da cicatrização da pele (LING & MURALI, 2019). Além disso, também já foi descrita como uma via extremamente necessária para o processo de cicatrização (SINNO & PRAKASH, 2013). No entanto, uma ativação inadequada ou exacerbada da via do sistema complemento pode resultar em morte celular de forma demasiada, aumentando a inflamação e, por consequência, dificultando o processo de cicatrização, tal como é visto em casos de feridas crônicas (SATYAM et al., 2019; VANDENDRIESSCHE et al., 2021). Inclusive, a atenuação da ativação do sistema complemento utilizando inibidores específicos tem sido descrita como uma estratégia terapêutica para o tratamento de feridas, principalmente as crônicas, onde a ativação encontra-se descompensada (CAZANDER et al., 2012).

O processo de cicatrização da pele é extremamente complexo e

orquestrado de maneira que suas etapas e vias de sinalização associadas ocorram de maneira interdependente entre si (MAHESWARY et al., 2021). A fase inflamatória, por exemplo, é ativada durante as cascatas de coagulação, e inúmeros mediadores químicos, como citocinas e histamina, são liberados durante a ativação desta cascata, além da via de ativação do sistema complemento. A sincronização destas pequenas etapas, é um dos fatores que favorecerá o recrutamento de leucócitos no local da lesão durante a fase inflamatória no processo de cicatrização da pele (SATYAM et al., 2019). A proliferação e diferenciação celular, além da manutenção de homeostase, são eventos importantes para o processo de cicatrização, e estes, por sua vez, também podem estar relacionados à via de sinalização do hormônio tireoidiano, a qual apresenta uma diversidade de funções em termos de desenvolvimento individual, celular e até mesmo, de metabolismo da glicose (VAN DER SPEK et al., 2017). O hormônio tireoidiano é capaz de acelerar a formação da barreira epidérmica, através do aumento da atividade de enzimas do ciclo do sulfato de colesterol, o qual regula a diferenciação epidérmica (SAFER et al., 2013), diferentemente do que ocorre em pacientes com hipotireoidismo, que apresentam dificuldade na formação da barreira epidérmica (ZHANG et al., 2019).

Ainda no dia 1, mas em se tratando dos miRNAs que apresentaram uma diminuição em sua expressão, a via de sinalização Hippo, também conhecida como Salvador / Warts, relaciona-se ao processo de cicatrização através da regulação da proliferação e da diferenciação celular, principalmente, e da apoptose (ELBEDIWIY et al., 2016). A Hippo associa-se ao processo de cicatrização através da regulação do gene *Yap1*, o qual possui importante papel no controle de determinados tipos celulares importantes para o desenvolvimento epidérmico e no reparo de feridas na pele (DEY et al., 2020). A localização do gene é nuclear e é observado na camada basal da pele, no processo de cicatrização estes níveis aumentam consideravelmente (ZHAO et al., 2014).

A via de sinalização do TGF- β está envolvida em inúmeros processos celulares, desde o desenvolvimento embrionário a organismos já adultos. O TGF- β , no processo de cicatrização da pele, auxilia na promoção do fechamento da ferida através de dois pontos principais: a produção de proteínas da matriz extracelular e a inibição de metaloproteinases (MMPs) da matriz (WALTON et al., 2017). Ademais, o TGF- β 1 aumenta a expressão de diversos componentes da matriz extracelular, com a fibronectina e seu receptor (FINNISON et al., 2013). Contudo, a produção exacerbada de TGF- β , através de uma ativação inadequada de sua via, resulta na produção de um tecido fibroso, que pode

comprometer a função normal do tecido (LIARTE et al., 2020).

No dia 5, dentre os quatro miRNAs mais recorrentes que apresentaram aumento em sua expressão, destacam-se, mais uma vez, as vias de sinalização do TGF- β e do hormônio tireoidiano. Uma via que não foi observada nas análises realizadas no dia 1 e que apresentam relação com o processo de cicatrização é a via FoxO, a qual pode regular cerca de 30 genes em murinos, o que legitima o seu envolvimento em inúmeros processos biológicos (RAJENDRAN et al., 2018). A FoxO é uma família de proteínas que diferem entre si devido à capacidade de ligar-se em diferentes domínios de ligação do DNA, resultando em diversas propriedades biológicas (URBANEK et al., 2016). Os fatores de transcrição da FoxO, os chamados fatores homeostáticos, já mostraram-se estar envolvidos no processo de cicatrização de feridas e de regeneração de tecidos. Entretanto, seu mecanismo de ação e sua função ainda não estão completamente compreendidos (LINK & FERNANDEZ-MARCOS, 2017). A regulação do citoesqueleto de actina é mais uma via observada no quinto dia. O citoesqueleto de actina pode ser considerado um importante regulador para inúmeros processos fisiológicos que, conseqüentemente, serão importantes para que a cicatrização da pele ocorra de maneira eficiente. Atualmente, novos reguladores do citoesqueleto actina vêm sendo estudados para melhor compreender seus mecanismos nas células da pele e na reparação de tecidos (KOPECKI & COWIN, 2016; MOLINAS et al., 2017).

A via de sinalização Hippo também está presente no quinto dia de análise do processo de cicatrização associada aos miRNAs que apresentaram uma diminuição em sua expressão. Ademais, a via de sinalização ErbB também se mostra relacionada à cicatrização, através da regulação de, aproximadamente, pelo menos vinte genes em murinos, resultando em respostas biológicas tais como: proliferação, diferenciação e motilidade celular (KAZANIETZ et al., 2016).

6 Conclusão

A presente revisão sistemática apresenta algumas limitações que devem ser destacadas. Nos estudos selecionados, foram utilizadas diferentes cepas de camundongo, ainda que haja uma determinada cepa mais frequentemente descrita, as diferenças entre elas devem ser consideradas. Visto que o padrão de expressão do miRNA pode ser diferente quando comparado a diferentes cepas, bem como as vias de sinalização que podem estar associadas ao processo de cicatrização da pele (BLEUL et al., 2021). A análise dos miRNAs em tempos completamente distintos entre si é mais uma limitação, já que o processo de cicatrização da pele, além de extremamente complexo, não ocorre em apenas um determinado tempo fixo, mas sim em fases e que levam dias (RODRIGUES et al., 2019).

A necessidade de uma padronização nos dois pontos citados legitima o objetivo inicial do estudo: identificar os miRNAs e suas respectivas vias de sinalização associados à cicatrização, pois para tal é adequado que haja uma determinada homogeneidade nas variáveis a serem estudadas para que as análises sejam realizadas de uma maneira geral sem indícios de alterações devido a diferentes cepas ou diferentes tempos de análise utilizados.

Referências

- ACHKAR, N. P.; CAMBIAGNO, D. A.; MANAVELLA, P. A. miRNA biogenesis: a dynamic pathway. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 12, p. 1034 – 1044, 2016.
- ALI SYEDA, Z.; LANGDEN, S. S. S.; MUNKHZUL, C; et al. Regulatory mechanism of microRNA expression in cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 5, p. 1723, 2020.
- ALMEIDA, M. I.; REIS, R. M.; CALIN, G. A. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 717, n. 1 – 2, p. 1 – 8, 2011.
- ALONSO-BETANZOS, A.; BOLÓN-CANEDO, V.; MORÁN-FERNÁNDEZ, L.; et al. A review of microarray datasets: where to find them and specific characteristics. **Microarray Bioinformatics**, p. 65 – 85, 2019.
- ASSMANN, T. S.; RECAMONDE-MENDOZA, M.; De SOUZA, B. M.; et al. MicroRNA expression profiles and type 1 diabetes mellitus: systematic review and bioinformatic analysis. **Endocrine connections**, v. 6, n. 8, p. 773 – 790, 2017.
- BAN, E.; JEONG, S.; PARK, M.; et al. Accelerated wound healing in diabetic mice by miRNA-497 and its anti-inflammatory activity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 121, p. 109613, 2020.
- BANERJEE, J.; SEN, C. K. microRNA and wound healing. In *microRNA: Medical Evidence*. **Springer**, p. 291 – 305, 2015.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n.2, p. 281 – 297, 2004.
- BHASKARAN, M.; MOHAN, M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. **Veterinary pathology**, v. 51, n. 4, p. 759 – 774, 2014.
- BI, S.; CHAI, L.; YUAN, X.; et al. MicroRNA-98 inhibits the cell proliferation of human hypertrophic scar fibroblasts via targeting Col1A1. **Biological research**, v. 50, n. 1, p. 1 – 8, 2017.
- BOICE, J. An Exploration of Systematic Review Publication Trends in Conservation Biology Journals. **Issues in Science and Technology Librarianship**, n. 91, 2019.
- BOSCAINO, V.; FIANNACA, A.; LA PAGLIA, L.; et al. MiRNA therapeutics based on logic circuits of biological pathways. **BMC bioinformatics**, v. 20, n. 9, p. 1712, 2019.
- BRESLAVETS, M.; LAPA, T. The tangential punch biopsy. **Dermatology**

online journal, v. 25, n. 12, 2019.

BRUBAKER, A. L.; CARTER, S. R.; Kovacs, E. J. Experimental approaches to tissue injury and repair in advanced age. **Immunosenescence**, p. 35 – 51, 2015.

CAMARILLO, C.; SWERDEL, M.; HART, R. P. Comparison of microarray and quantitative real-time PCR methods for measuring MicroRNA levels in MSC cultures. In *Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications*. **Humana Press**, p. 419 – 429, 2011.

CAO, D.; SERBAN, K.; PETRACHE, I. Effects of miR-126-enriched endothelial microparticles released during cigarette smoke exposure on endothelial cell migration and proliferation. **American Thoracic Society**, p. A1216 – A1216, 2017.

CATALANOTTO, C.; COGONI, C.; ZARDO, G. MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 10, p. 1712, 2016.

CECH, T. R.; STEITZ, J. A. The noncoding RNA revolution—trashing old rules to forge new ones. **Cell**, v. 157, n. 1. p. 77 – 94, 2014.

CHALMERS, I.; FOX, D. M. Increasing the incidence and influence of systematic reviews on health policy and practice, p. 11 – 13, 2016.

CHEN, Y.; ZHAO, H.; TAN, Z.; et al. Bottleneck limitations for microRNA-based therapeutics from bench to the bedside. **An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, n. 3, 147 – 154, 2015.

CHEN, L.; HEIKKINEN, L.; WANG, C.; et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools. **Briefings in bioinformatics**, v. 20, n. 5, p. 1836 – 1852, 2018.

CHEN, L.; SIMÕES, A.; CHEN, Z.; et al. Overexpression of the oral mucosa-specific microRNA-31 promotes skin wound closure. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 15, p. 3679, 2019.

CHEN, P. S.; LIN, S. C.; TSAI, S. J. Complexity in regulating microRNA biogenesis in cancer. **Experimental Biology and Medicine**, v. 245, n. 5, p. 395 – 401, 2020.

CIFUENTES-BERNAL, A. M.; PHAM, V. V.; LI, X.; et al. A pseudotemporal causality approach to identifying miRNA–mRNA interactions during biological processes. **Bioinformatics**, v. 37, n. 6, p. 807 – 814, 2021.

CAZANDER, G; JUKEMA, G N.; NIBBERING, P H. Complement activation and inhibition in wound healing. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

CIRILLO, F.; CATELLANI, C.; LAZZERONI, P.; et al. The role of MicroRNAs in influencing body growth and development. **Hormone research in paediatrics**, v. 93, n. 1, p. 7 – 15, 2020.

COOK, C. N.; POSSINGHAM, H. P.; FULLER, R. A. Contribution of systematic reviews to management decisions. **Conservation Biology**, v. 27, n. 5, p. 902 – 915, 2013.

COSTA, R. A.; RUIZ-de-SOUZA, V.; AZEVEDO Jr, G. M.; et al. Effects of strain and age on ear wound healing and regeneration in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 12, p. 1143 – 1149, 2009.

CREUGNY, A.; FENDER, A.; PFEFFER, S. Regulation of primary microRNA processing. **FEBS Letters**, v. 592, n. 12, p. 1980 – 1996, 2018.

de PLANELL-SAGUER, M.; RODICIO, M. C. Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review. **Analytica chimica acta**, v. 699, n. 2, p. 134 – 152, 2011.

DEXHEIMER, P. J.; COCHELLA, L. MicroRNAs: from mechanism to organism. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 8, p. 409, 2020.

DEY, A.; VARELAS, X.; GUAN, K. L. Targeting the Hippo pathway in cancer, fibrosis, wound healing and regenerative medicine. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 19, n. 7, p. 480 – 494, 2020.

DUNN, L.; PROSSER, H. C.; TAN, J. T.; et al. Murine model of wound healing. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, v. 75, p. e50265, 2013.

EL AYADI, A.; JAY, J. W.; PRASAI, A. Current approaches targeting the wound healing phases to attenuate fibrosis and scarring. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 3, p. 1105, 2020.

ELBEDIWY, A.; VINCENT-MISTIAEN, Z. I.; SPENCER-DENE, B.; et al. Integrin signalling regulates YAP and TAZ to control skin homeostasis. **Development**, v. 143, n. 10, p. 1674 – 1687, 2016.

ELLIS, S.; LIN, E. J.; TARTAR, D. Immunology of wound healing. **Current dermatology reports**, v. 7, n. 4, p. 350-358, 2018.

FAN, W. P. L.; RASHID, M.; ENOCH, S. Current advances in modern wound healing. **Wounds UK**, v. 6, n. 3, p. 22 – 36, 2010.

FARAHANI, M.; REZAEI-TAVIRANI, M.; ARJMAND, B. A systematic review of microRNA expression studies with exposure to bisphenol A. **Journal of Applied Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 4 – 19, 2021.

FINNISON, K. W.; MCLEAN, S.; Di GUGLIELMO, G. M.; et al. Dynamics of transforming growth factor beta signaling in wound healing and scarring. **Advances in wound care**, v. 2, n. 5, p. 195 – 214, 2013.

FORERO, D. A.; GONZÁLEZ-GIRALDO, Y.; CASTRO-VEGA, L. J.; et al. qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs. **Biotechniques**, v. 67, n. 4, p. 192 – 199, 2019.

FRIEDLÄNDER, M. R.; LIZANO, E.; HOUBEN, A. J.; et al. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. **Genome biology**, v. 15, n. 4, p. 1 – 17, 2014.

GABISONIA, K.; PROSDOCIMO, G.; AQUARO, G. D.; et al. MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs. **Nature**, v. 569, n. 7756, p. 418 – 422, 2019.

GEBERT, L. F.; MACRAE, I. J. Regulation of microRNA function in animals. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 20, n. 1, p. 21 – 37, 2019. GIRALDEZ, A. J.; CINALLI, R. M.; GLASNER, M. E.; et al. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. **Science**, v. 308, n. 5723, p. 833 – 838, 2005.

GLAICH, O.; PARIKH, S.; BELL, R. E; et al. DNA methylation directs microRNA biogenesis in mammalian cells. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1 – 11, 2019.

GLASS II, D. A. Current understanding of the genetic causes of keloid formation. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 18, n. 2, p. S50 – S53, 2017.

GMEREK, L.; MARTYNIK, K.; HORBACKA, K; et al. MicroRNA regulation in colorectal cancer tissue and serum. **PloS one**, v. 14, n. 8, p. e0222013, 2019. GOPALAKRISHNAN, S.; GANESHKUMAR, P. Systematic reviews and meta-analysis: understanding the best evidence in primary healthcare. **Journal of family medicine and primary care**, v. 2, n. 1, p. 9, 2013.

GOTTRUP, F.; DISSEMOND, J.; BAINES, C.; et al. Use of oxygen therapies in wound healing: focus on topical and hyperbaric oxygen treatment. **Journal of wound care**, v. 26, n. Sup5, p. S1 – S43, 2017.

GRIFFITHS-JONES, S. The microRNA registry. **Nucleic acids research**, v. 32, n. suppl_1, p. D109 – D111, 2004.

GRIFFITHS-JONES, S.; SAINI, H. K.; VAN DONGEN, S.; et al. miRBase: tools for microRNA genomics. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl_1, p. D154 – D158, 2007.

GROSS, N.; KROPP, J.; KHATIB, H. MicroRNA signaling in embryo development. **Biology**, v. 6, n. 3, p. 34, 2017.

GUO, J.; LIN, Q.; SHAO, Y.; et al. miR-29b promotes skin wound healing and reduces excessive scar formation by inhibition of the TGF- β 1/Smad/CTGF signaling pathway. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 95, n. 4, p. 437 – 442, 2017.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 15, n. 8, p. 509 – 524, 2014.

HAMMOND, S. M. An overview of microRNAs. **Advanced drug delivery reviews**, v. 87, p. 3 – 14, 2015.

HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic wound healing: a review of current management and treatments. **Advances in therapy**, v. 34, n. 3, p. 599 – 610, 2017.

HE, L.; ZHU, C.; JIA, J.; et al. ADSC-Exos containing MALAT1 promotes wound healing by targeting miR-124 through activating Wnt/ β -catenin pathway. **Bioscience reports**, v. 40, n. 5, p. BSR20192549, 2020.

HODGKINSON, G. P.; FORD, J. K. Narrative, meta-analytic, and systematic reviews: What are the differences and why do they matter?. **Journal of Organizational Behavior**, v. 35, n. S2, p. S1 – S5, 2014.

HU, Y.; RAO, S. S.; WANG, Z. X.; et al. Exosomes from human umbilical cord blood accelerate cutaneous wound healing through miR-21-3p-mediated promotion of angiogenesis and fibroblast function. **Theranostics**, v. 8, n. 1, p. 169, 2018.

HUANG, Y.; SHEN, X. J.; ZOU, Q.; et al. Biological functions of microRNAs: a review. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 67, n. 1, p. 129 – 139, 2011.

HUANG, C.; LEAVITT, T.; BAYER, L. R.; et al. Effect of negative pressure wound therapy on wound healing. **Current problems in surgery**, v. 51, n. 7, p. 301 – 331, 2014.

JACKSON, S. J.; ANDREWS, N.; BALL, D.; et al. Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes. **Laboratory animals**, v. 51, n. 2, p. 160 – 169, 2017.

JÄRBRINK, K.; NI, G.; SÖNNERGREN, H.; et al. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. **Systematic reviews**, v. 5, n. 1, p. 152, 2016.

JUŻWIK, C. A.; DRAKE, S. S.; ZHANG, Y.; et al. microRNA dysregulation in neurodegenerative diseases: A systematic review. **Progress in neurobiology**, v. 182, p. 101664, 2019.

KARPPINEN, S. M.; HELJASVAARA, R.; GULLBERG, D.; et al. Toward understanding scarless skin wound healing and pathological scarring. **F1000Research**, v. 8, 2019.

KASPER, D. M.; MORO, A.; RISTORI, E.; et al. MicroRNAs establish uniform traits during the architecture of vertebrate embryos. **Developmental cell**, v. 40, n. 6, p. 552-565, 2017.

KAZANIETZ, M. G.; BARRIO-REAL, L.; CASADO-MEDRANO, V.; et al. The P-Rex1/Rac signaling pathway as a point of convergence for HER/ErbB receptor and GPCR responses. **Small GTPases**, v. 9, n. 4, p. 297 – 303, 2018.

KINSER, H. E.; PINCUS, Z. MicroRNAs as modulators of longevity and the aging process. **Human genetics**, v. 138, n. 3, p. 291 – 308, 2020.

KONG, X.; DUAN, Y.; SANG, Y.; et al. LncRNA–CDC6 promotes breast cancer progression and function as ceRNA to target CDC6 by sponging microRNA-215. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 6, p. 9105 – 9117, 2019.

KOPECKI, Z.; COWIN, A. J. The role of actin remodelling proteins in wound healing and tissue regeneration. **IntechOpen**, p. 133 – 154, 2016.

KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p.

D155 – D162, 2019.

KRZYSZCZYK, P.; SCHLOSS, R.; PALMER, A.; et al. The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 419, 2018.

KUMAR, S.; REDDY, P. H. A new discovery of MicroRNA-455-3p in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 72, n. S1, p. S117 – S130, 2019.

LANG, H.; ZHAO, F.; ZHANG, T.; et al. MicroRNA-149 contributes to scarless wound healing by attenuating inflammatory response. **Molecular medicine reports**, v. 16, n. 2, p. 2156 – 2162, 2017.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843 – 854, 1993.

LEE, C. T.; RISOM, T.; STRAUSS, W. M. MicroRNAs in mammalian development. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 78, p. 129 -139, 2006.

LEE, B. P.; BURIC, I.; GEORGE-PANDETH, A.; et al. MicroRNAs miR-203-3p, miR-664-3p and miR-708-5p are associated with median strain lifespan in mice. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1 – 10, 2017.

LI, D.; WANG, A.; LIU, X.; et al. MicroRNA-132 enhances transition from inflammation to proliferation during wound healing. **The Journal of clinical investigation**, v. 125, n. 8, p. 3008 – 3026, 2015.

LI, X.; LI, D.; WANG, A.; et al. MicroRNA-132 with therapeutic potential in chronic wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 12, p. 2630 – 2638, 2017.

LI, Y.; ZHANG, J.; Lei, Y.; et al. MicroRNA-21 in skin fibrosis: potential for diagnosis and treatment. **Molecular diagnosis & therapy**, v. 21, n. 6, p. 633 – 642, 2017.

LI, Z.; LIU, Z. M.; XU, B. H. A meta-analysis of the effect of microRNA-34a on the progression and prognosis of gastric cancer. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 23, p. 8281 – 7, 2018.

LIANG, Z.; CHI, Y. J.; LIN, G. Q.; et al. MiRNA-26a promotes angiogenesis in a rat model of cerebral infarction via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathway. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 11, p. 3485 – 3492, 2018.

LIARTE, S.; BERNABÉ-GARCÍA, Á.; NICOLÁS, F. J. Role of TGF- β in skin chronic wounds: a keratinocyte perspective. **Cell**, v. 9, n. 2, p. 306, 2020.

LINK, W.; FERNANDEZ-MARCOS, P. J. FOXO transcription factors at the interface of metabolism and cancer. **International journal of cancer**, v. 141, n. 12, p. 2379 – 2391, 2017.

LINDENBLATT, N.; CALCAGNI, M.; CONTALDO, C.; et al. A new model for

studying the revascularization of skin grafts in vivo: the role of angiogenesis. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 122, n. 6, p. 1669 – 1680, 2008.

LING, M; MURALI, M. Analysis of the complement system in the clinical immunology laboratory. **Clinics in laboratory medicine**, v. 39, n. 4, p. 579-590, 2019.

LIU, J.; CARMELL, M. A.; RIVAS, F. V.; et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science**, v. 305, n. 5689, p. 1437 – 1441, 2004.

LIU, Y. F.; DING, M.; LIU, D. W.; et al. MicroRNA profiling in cutaneous wounds of diabetic rats. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 9614 – 25, 2015.

LIU, H.; WANG, C.; LI, C.; et al. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. **RSC advances**, v. 8, n. 14, p. 7533 – 7549, 2018.

LIU, Z.; DUMVILLE, J. C.; HINCHLIFFE, R. J.; et al. Negative pressure wound therapy for treating foot wounds in people with diabetes mellitus. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 10, 2018.

LU, T. X.; ROTHENBERG, M. E. MicroRNA. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 4, p. 1202 – 1207, 2018.

LU, J.; GETZ, G.; MISKA, E. A.; et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**, v. 435, n; 7043, p. 834 – 838, 2005.

LUAN, Y.; LIU, Y.; LIU, C.; et al. Serum miRNAs signature plays an important role in keloid disease. **Current molecular medicine**, v. 16, n. 5, p. 504 – 514, 2016.

MA, Q.; ZHANG, L.; PEARCE, W. J. MicroRNAs in brain development and cerebrovascular pathophysiology. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 317, n. 1, p. C3 – C 19, 2019.

MACHADO, M. J.; WATSON, M. G.; DEVLIN, A. H.; et al. Dynamics of angiogenesis during wound healing: a coupled in vivo and in silico study. **Microcirculation**, v. 18, n. 3, p. 183 – 197, 2011.

MAHESWARY, T.; NURUL, A. A.; FAUZI, M. B. The Insights of Microbes' Roles in Wound Healing: A Comprehensive Review. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 7, p. 981, 2021.

MALL, C.; ROCKE, D. M.; DURBIN-JOHNSON, B.; et al. Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential. **Biomarkers in medicine**, v. 7, n. 4, p. 623 – 631, 2013.

MASSON-MEYERS, D. S.; ANDRADE, T. A.; CAETANO, G. F.; et al. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. **International journal of experimental pathology**, v. 101, n. 1 – 2, p. 21 – 37, 2020.

MATSUYAMA, H.; SUZUKI, H. I. Systems and synthetic microRNA biology: from biogenesis to disease pathogenesis. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 1, p. 132, 2020.

MEMAR, M. Y.; YEKANI, M.; ALIZADEH, N.; et al. Hyperbaric oxygen therapy: Antimicrobial mechanisms and clinical application for infections. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 440 – 447, 2019.

MENG, Z.; ZHOU, D.; GAO, Y.; et al. miRNA delivery for skin wound healing. **Advanced drug delivery reviews**, v. 129, p. 308-318, 2018.

MENS, M. M.; GHANBARI, M. Cell cycle regulation of stem cells by microRNAs. **Stem cell reviews and reports**, v. 13, n. 3, p. 309 – 322, 2018.

MERCANDETTI, M.; COHEN, A. J. Wound healing and repair. **Emedicine**, v. 14, n. 1, p. 12 – 20, 2017.

MICHAEL, S.; SORG, H.; PECK, C. T.; et al. The mouse dorsal skin fold chamber as a means for the analysis of tissue engineered skin. **Burns**, v. 39, n. 1, 82 – 88, 2013.

MICHLEWSKI, G.; CÁCERES, J. F. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. **Rna**, v. 25, n. 1, p. 1 -16, 2019.

MISCIANINOV, V.; MARTELLO, A.; ROSE, L.; et al. MicroRNA-148b targets the TGF- β pathway to regulate angiogenesis and endothelial-to-mesenchymal transition during skin wound healing. **Molecular Therapy**, v. 26, n. 8, p. 1996 – 2007, 2018.

MOLLAEI, H.; SAFARALIZADEH, R.; ROSTAMI, Z. MicroRNA replacement therapy in cancer. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 8, p. 12369 – 12384, 2019.

MOLINAS, A.; TURKINA, M. V.; MAGNUSSON, K. E.; et al. Perturbation of wound healing, cytoskeletal organization and cellular protein networks during hantaan virus infection. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 5, p. 98, 2017.

MULHOLLAND, E. J.; DUNNE, N.; MCCARTHY, H. O. MicroRNA as therapeutic targets for chronic wound healing. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, v. 8, p. 46 – 55, 2017.

NACHTERGAELE, S.; HE, C. The emerging biology of RNA post-transcriptional modifications. **RNA biology**, v. 14, n. 2, p. 156 – 163, 2017.

NADON, N. L.; STRONG, R.; MILLER, R. A.; et al. NIA interventions testing program: investigating putative aging intervention agents in a genetically heterogeneous mouse model. **EBioMedicine**, v. 21, p. 3 – 4, 2017.

O'BRIEN, J.; HAYDER, H.; ZAYED, Y.; et al. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. **Frontiers in endocrinology**, v. 9, p. 402, 2018.

OPNEJA, A.; KAPOOR, S.; STAVROU, E. X. Contribution of platelets, the

coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. **Thrombosis research**, v. 179, p. 56 – 63, 2019.

OTTO, T.; CANDIDO, S. V.; PILARZ, M. S.; et al. Cell cycle-targeting microRNAs promote differentiation by enforcing cell-cycle exit. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 40, p. 10660 – 10665, 2017.

PASQUINELLI, A. E.; REINHART, B. J.; SLACK, F.; et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature**, v. 408, n. 6808, p. 86 – 89, 2000.

PENG, Y.; CROCE, C. M. The role of MicroRNAs in human cancer. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 1, n. 1, p. 1 – 9, 2016.

PEREIRA, R. F.; BARTOLO, P. J. Traditional therapies for skin wound healing. **Advances in wound care**, v. 5, n. 5, p. 208-229, 2016.

POWERS, J. G.; HIGHAM, C.; BROUSSARD, K.; et al. Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, b. 74, n. 4, p. 607 – 625 2016.

PUTTEERAJ, M.; FAIRUZ, Y. M.; TEOH, S. L. MicroRNA dysregulation in Alzheimer's disease. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 16, n. 9, p. 1000 – 1009, 2017.

QING, L.; CHEN, H.; TANG, J.; et al. Exosomes and their microRNA cargo: new players in peripheral nerve regeneration. **Neurorehabilitation and neural repair**, v. 32, n. 9, p. 765 – 776, 2018.

RAJENDRAN, N. K.; KUMAR, S. S. D.; HOURELD, N. N.; et al. Understanding the perspectives of forkhead transcription factors in delayed wound healing. **Journal of cell communication and signaling**, v. 13, n. 2, p. 151 – 162, 2019.

REINHART, B. J.; SLACK, F. J.; BASSON, M.; et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 901 – 906, 2000.

RITSKES-HOITINGA, M.; LEENAARS, M.; AVEY, M.; et al. Systematic reviews of preclinical animal studies can make significant contributions to health care and more transparent translational medicine, 2014.

RODEN, C.; MASTRIANO, S.; WANG, N.; et al. microRNA expression profiling: technologies, insights, and prospects. In *microRNA: Medical Evidence*. **Springer**, p. 409 – 421, 2015.

RUPAIMOOLE, R.; SLACK, F. J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nature reviews Drug discovery**, v. 16, n. 3, p. 203 – 222, 2017.

SAFER, J. D. Thyroid hormone and wound healing. **Journal of thyroid research**, v. 2013, 2013.

SALEH, B.; DHALIWAL, H. K.; PORTILLO-LARA, R.; et al. Local

immunomodulation using an adhesive hydrogel loaded with miRNA-laden nanoparticles promotes wound healing. **Small**, v. 15, n. 36, p. 1902232, 2019.

SALIMINEJAD, K.; KHORRAM KHORSHID, H. R.; SOLEYMANI FARD, S.; et al. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 5, p. 5451 – 5465, 2019.

SATYAM, A.; GRAEF, E. R.; LAPCHAK, P. H.; et al. Complement and coagulation cascades in trauma. **Acute medicine & surgery**, v. 6, n. 4, p. 329 – 335, 2019.

SCAPAGNINI, G.; MARCHEGIANI, A.; ROSSI, G.; et al. Management of all three phases of wound healing through the induction of fluorescence biomodulation using fluorescence light energy. **International Society for Optics and Photonics**, v. 10863, p. 108630W, 2019.

SEN, C. K. Human wounds and its burden: an updated compendium of estimates, p. 39 – 48, 2019.

SERRA, M. B.; BARROSO, W. A.; SILVA, N. N. D.; et al. From inflammation to current and alternative therapies involved in wound healing. **International Journal of Inflammation**, v. 2017, 2017.

SHI, Y.; WANG, L.; YU, P.; et al. MicroRNA-486-5p inhibits the growth of human hypertrophic scar fibroblasts by regulating Smad2 expression. **Molecular medicine reports**, v. 19, n. 6, p. 5203 – 5210, 2019.

SHIMBO, K.; OKUHARA, Y.; YOKOTA, K. Usability of a biopsy punch to form an elliptical arteriotomy for end-to-side anastomosis. **Microsurgery**, 2020.

SHU, Y. J.; BAO, R. F.; JIANG, L.; et al. MicroRNA-29c-5p suppresses gallbladder carcinoma progression by directly targeting CPEB4 and inhibiting the MAPK pathway. **Cell Death & Differentiation**, v. 24, n. 3, p. 218 – 222, 2017.

SHUKLA, S. K.; SHARMA, A. K.; GUPTA, V.; et al. Pharmacological control of inflammation in wound healing. **Journal of tissue viability**, v. 28, n. 4, p. 218 – 222, 2019.

SILVEIRA, R. G.; FERRÚA, C. P.; do AMARAL, C. C.; et al. MicroRNAs expressed in neuronal differentiation and their associated pathways: systematic review and bioinformatics analysis. **Brain research bulletin**, v. 157, p. 140 – 148, 2020.

SINNO, H.; PRAKASH, S. Complements and the wound healing cascade: an updated review. **Plastic surgery international**, v. 2013, 2013.

SLACK, F. J.; BASSON, M.; LIU, Z.; et al. The lin-41 RBCC gene acts in the C. elegans heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. **Molecular cell**, v. 5, n. 4, p. 659 – 669, 2000.

SOBEST: Associação Brasileira de Estomaterapia. (2016). Associação Brasileira de Estomaterapia realiza campanha de prevenção da úlcera por pressão. **SOBEST**. Disponível em: < <http://www.sobest.org.br/texto/41>>.

Acesso em: 15 set 2021.

SOLIMAN, A. M.; DAS, S.; ABD GHAFAR, N.; et al. L. Role of microRNA in proliferation phase of wound healing. **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 38, 2018.
SORG, H.; KRUEGER, C.; VOLLMAR, B. Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. **Journal of anatomy**, v. 211, n. 6, p. 810 – 818, 2007.

TAKAMIZAWA, J.; KONISHI, H.; YANAGISAWA, K.; et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. **Cancer research**, v. 64, n. 11, p. 3753 – 3756, 2004.

TIAN, T.; WANG, J.; ZHOU, X. A review: microRNA detection methods. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 13, n. 8, p. 2226 – 2238, 2015.

TIWARI, A.; MUKHERJEE, B.; DIXIT, M. MicroRNA key to angiogenesis regulation: miRNA biology and therapy. **Current cancer drug targets**, v. 18, n. 3, p. 266 – 277, 2018.

TOTTOLI, E. M.; DORATI, R.; GENTA, I.; et al. Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 8, p. 735, 2020.

TÜFEKCI, K. U.; MEUWISSEN, R. L. J.; GENÇ, Ş. The role of microRNAs in biological processes. **miRNomics: microRNA biology and computational analysis**, p. 15 – 31, 2014.

TUO, L.; CHU, X.; SHA, S.; et al. MicroRNA and lung cancer: a mini review. **Chinese Journal of Lung Cancer**, v. 21, n. 9, 2018.

URBANEK, P.; KLOTZ, L. O. Posttranscriptional regulation of FOXO expression: microRNAs and beyond. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 12, p. 1514 – 1532, 2017.

van der SPEK, A. H.; FLIERS, E.; BOELEN, A. Thyroid hormone metabolism in innate immune cells. **Journal of Endocrinology**, v. 232, n. 2, p. R67 – R81, 2017.

VANDENDRIESSCHE, S.; CAMBIER, S.; PROOST, P.; et al. Complement Receptors and Their Role in Leukocyte Recruitment and Phagocytosis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 144, 2021.

VERDUCI, L.; STRANO, S.; YARDEN, Y.; et al. The circRNA–microRNA code: emerging implications for cancer diagnosis and treatment. **Molecular oncology**, v. 13, n. 4, p. 669 – 680, 2019.

VISHNOI, A.; RANI, S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview. **MicroRNA Profiling**, p. 1 – 10, 2017.

WALLACE, H. A.; BASEHORE, B. M.; & ZITO, P. M. Wound healing phases. **StatPearls**, 2017.

WALTON, K. L.; JOHNSON, K. E.; HARRISON, C. A. Targeting TGF- β

mediated SMAD signaling for the prevention of fibrosis. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 461, 2017.

WANG, Q.; WANG, Y.; MINTO, A. W.; et al. MicroRNA-377 is up-regulated and can lead to increased fibronectin production in diabetic nephropathy. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 12, p. 4126 – 4135, 2008.

WANG, J. M.; TAO, J.; CHEN, D. D.; et al. MicroRNA miR-27b rescues bone marrow–derived angiogenic cell function and accelerates wound healing in type 2 diabetes mellitus. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 34, n. 1, p. 99 – 109, 2014

WANG, W.; YANG, C.; yi WANG, X.; et al. MicroRNA-129 and-335 promote diabetic wound healing by inhibiting Sp1-mediated MMP-9 expression. **Diabetes**, v. 67, n. 8, p. 1627 – 1638, 2018.

WITWER, K. W.; HALUSHKA, M. K. Toward the promise of microRNAs–Enhancing reproducibility and rigor in microRNA research. **RNA biology**, v. 13, n. 11, p. 1103 – 1116, 2016.

WOJCIECHOWSKA, A.; BRANIEWSKA, A.; KOZAR-KAMIŃSKA, K. MicroRNA in cardiovascular biology and disease. **Advances in clinical and experimental medicine**, v. 26, n. 5, p. 865 – 874, 2017.

WONG, V. W.; SORKIN, M.; GLOTZBACH, J. P.; et al. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, 2010.

WOSGRAU, A. C. C.; JEREMIAS, T. D. S.; LEONARDI, D. F.; et al. Comparative experimental study of wound healing in mice: Pelnac versus Integra. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120322, 2015.

WU, K.; HE, J.; PU, W.; et al. The role of exportin-5 in microRNA biogenesis and cancer. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 16, n. 2, p. 120 – 126, 2018.

XIA, H. Q.; PAN, Y.; PENG, J. et al. Over-expression of miR375 reduces glucose-induced insulin secretion in Nit-1 cells. **Molecular biology reports**, v. 38, n. 5, p. 3061 – 3065, 2011.

XU, G.; CHEN, J.; JING, G.; et al. Thioredoxin-interacting protein regulates insulin transcription through microRNA-204. **Nature medicine**, v. 19, n. 9, p. 1141 – 1146, 2013.

YAMAKAWA, S.; HAYASHIDA, K. Advances in surgical applications of growth factors for wound healing. **Burns & trauma**, v. 7, 2019.

YAO, S. MicroRNA biogenesis and their functions in regulating stem cell potency and differentiation. **Biological procedures online**, v. 18, n. 1, p. 1 – 10, 2016.

YAO, Q.; CHEN, Y.; ZHOU, X. The roles of microRNAs in epigenetic regulation. **Current opinion in chemical biology**, v. 51, p. 11 – 17, 2019.

YE, J.; KANG, Y.; SUN, X.; et al. MicroRNA-155 inhibition promoted wound

healing in diabetic rats. **The international journal of lower extremity wounds**, v. 16, n. 2, p. 74 – 84, 2017.

ZGHEIB, C.; HILTON, S. A.; DEWBERRY, L. C.; et al. Use of cerium oxide nanoparticles conjugated with microRNA-146a to correct the diabetic wound healing impairment. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 228, n. 1, p. 107 – 115, 2019.

ZHANG, B.; WANG, Q. MicroRNA-based biotechnology for plant improvement. **Journal of cellular physiology**, v. 230, n. 1, p. 1 – 15, 2015.

ZHANG, G. Y.; LANGAN, E. A.; MEIER, N. T.; et al. Thyroxine (T4) may promote re-epithelialisation and angiogenesis in wounded human skin ex vivo. **PloS one**, v. 14, n. 3, p. 13, 2019.

ZHANG, L.; LIAO, Y.; TANG, L. MicroRNA-34 family: a potential tumor suppressor and therapeutic candidate in cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, p. 1 – 13, 2019.

ZHAO, R.; FALLON, T. R.; SALADI, S. V.; et al. Yap tunes airway epithelial size and architecture by regulating the identity, maintenance, and self-renewal of stem cells. **Developmental cell**, v. 30, n. 2, p. 151 – 156, 2014.

ZHAO, Z.; SUN, W.; GUO, Z.; et al. Mechanisms of lncRNA/microRNA interactions in angiogenesis. **Life sciences**, v. 254, p. 116900, 2020.