



# UTILIDAD DIAGNÓSTICA Y PRONÓSTICA DEL MICRORNA-21 EN EL CÁNCER COLORRECTAL.

## DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC UTILITY OF SERUM MICRORNA-21 IN COLORECTAL CANCER.

Menéndez P\* , Villarejo P\*\*, Padilla D\*\* Menéndez JM\*\*\*, Rodríguez-Montes JA\*\*\*\*

\* Hospital Gutiérrez Ortega. Valdepeñas. Ciudad Real. España

\*\* Hospital General Universitario de Ciudad Real. Ciudad Real. España.

\*\*\* Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid. España.

\*\*\*\* Hospital Universitario La Paz. Madrid. España.

El presente estudio ha sido financiado con la ayuda otorgada por la  
Fundación para la Investigación Sanitaria en Castilla La Mancha (FISCAM)  
y por la Fundación Mutua Madrileña Investigación Médica.

### PALABRAS CLAVE:

MicroRNA, cáncer colorrectal, microRNA-21, diagnóstico.

### KEY WORDS

MicroRNA, colorectal cancer, microRNA-21.

### Correspondencia:

Dr. PABLO MENÉNDEZ SÁNCHEZ  
C/ Julio Palacios 29, Esc B-7ºB • 28029 Madrid  
E-mail: pablomensan@hotmail.com;  
pablo.menendez.sanchez@gmail.com

### RESUMEN

**INTRODUCCIÓN.** Los microRNAs son estructuras moleculares de 20-22 nucleótidos con actividad post-transcripcional que están implicados en la carcinogénesis mediante una regulación genética post-transcripcional. Presentamos un estudio prospectivo donde se determina la expresión sérica de microRNA-21 en pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma de colon.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Estudio de cohorte prospectivo de al menos 100 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma de colon, y de al menos 60 pacientes con apendicitis aguda como grupo control. Se realizó el análisis de microRNA-21 sérico mediante PCR de las muestras sanguíneas de los pacientes obtenidas de forma preoperatoria.

**RESULTADOS.** La comparación de la expresión del microRNA-21 sérico fue mayor en los pacientes con cáncer colorrectal que en los pacientes del grupo control, siendo el área bajo la curva de 0,603. En el análisis univariante, la expresión del miR-21 se relaciona de forma estadísticamente significativa con la recidiva local ( $p=0,025$ ) y con la mortalidad ( $p=0,029$ ). En el análisis multivariante también se puso de manifiesto que las expresiones mayores (sobreeexpresiones) de miR-21 se relacionaban con una reducción del riesgo de recidiva del 51%, mientras que dicha sobreeexpresión se relacionaba con una reducción de mortalidad del 50%.

**CONCLUSIONES.** La expresión del microRNA-21 sérico podría ser considerado como un potencial marcador diagnóstico para el cáncer colorrectal. La expresión sérica del microRNA-21 se correlaciona con la recidiva y mortalidad en el cáncer colorrectal. Nuestros resultados sugieren que el miR-21 sérico es un prometedor marcador diagnóstico y pronóstico, y pone de manifiesto su potencial utilidad clínica en el cáncer colorrectal.

### ABSTRACT

**BACKGROUND.** MicroRNAs (miRNAs) are small, noncoding RNAs that are involved in carcinogenesis through postranscriptional gene regulatory activity. Few studies have focused on the detection of miR-21 in serum rather than in tissue. The current study aimed to measure serum miR-21 expression levels and to evaluate their association with the outcome of colorectal cancer (CRC).

**METHODS.** Blood samples were collected from almost 100 CRC patients undergoing surgery with curative intent, and almost 60 control patients. The expression levels of miR-21 were measured using a quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR).

**RESULTS.** Serum microRNA-21 expression was higher in colorectal cancer patients than in control patients, with a ROC curve of 0.603. A univariate analysis revealed that lower expression levels of serum miR-21 were associated with higher local recurrence ( $p=0.025$ ) and mortality ( $p=0.029$ ). A logistic regression analysis demonstrated that the relative overexpression of miR-21 (expression >1) was associated with a 51% reduction in the risk of recurrence. A Cox regression analysis identified that a relative increase in miR-21 expression (>1) was associated with a 50% reduction in the risk of mortality.

**CONCLUSIONS.** Serum microRNA-21 expression could be considered as a potential diagnostic marker for colorectal cancer. The expression level of serum miR-21 correlates with the recurrence and mortality of CRC patients. Our results suggest that circulating serum miR-21 is a promising diagnostic and prognostic tumour marker, and they highlight the potential clinical utility of miR-21 in colorectal cancer.

## INTRODUCCION

Los microRNAs son estructuras moleculares de 20-22 nucleótidos con actividad post-transcripcional que están implicados en la regulación de la expresión genética, habiéndose puesto de manifiesto su participación en distintas funciones fisiológicas y patológicas tales como la apoptosis, la proliferación y la diferenciación celular, demostrándose su funcionalidad como genes supresores de tumores o como proto-oncogenes en la carcinogénesis.<sup>1,2</sup>

La implicación de los microRNAs sobre la estabilidad de la regulación del RNA en la expresión genética, ha llevado a determinar estas "moléculas no codificantes" de RNA en diferentes fluidos orgánicos (plasma, suero, orina, lágrima y saliva), habiéndose constatado una alta concentración de microRNAs libres en sangre periférica.<sup>3,4</sup>

En el cáncer colorrectal se han determinado cambios en los patrones de expresión de los microRNAs, siendo la tendencia actual que los microRNAs pueden actuar favoreciendo la oncogénesis, o bien actuando como supresores tumorales.<sup>5</sup>

Los objetivos del presente estudio son: **1)** Determinar los valores séricos de miRNA21 en enfermos con cáncer colorrectal con la finalidad de conocer su valor como marcador pronóstico y de diagnóstico. **2)** Relacionar los valores séricos de miR-21 respecto a las variables anatomopatológicas (localización, tamaño, necrosis tumoral, patrón histológico) que constituyen el sistema de estadificación TNM, así como con las variables pronósticas clínicas (supervivencia, recidiva, seguimiento).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Obtención de muestras

Estudio de cohorte prospectivo de al menos 100 enfermos con diagnóstico de cáncer colorrectal intervenidos quirúrgicamente en el Servicio de Cirugía General y de Aparato Digestivo, Hospital General de Ciudad Real, desde Diciembre de 2008 hasta Febrero de 2010; se incluyó también un grupo control de al menos 50 pacientes con diagnóstico de apendicitis aguda como grupo de enfermos con patología cólica benigna.

El grupo estudio está constituido por pacientes que ingresaron con el diagnóstico de adenocarcinoma colorrectal, para tratamiento quirúrgico con intención curativa. Previamente, se solicitaría el Consentimiento Informado para la integración de la correspondiente Historia Clínica en un proyecto de investigación. Tras la intervención quirúrgica, los pacientes fueron incluidos en el protocolo multidisciplinario de seguimiento del cáncer colorrectal.

Las muestras sanguíneas se obtuvieron preoperatoriamente a partir de una muestra de 5 ml de sangre periférica en tubo BD Vacutainer®. De forma inmediata, se procedía a su procesamiento para una conservación adecuada, obteniendo dos alícuotas de 2 ml de suero, almacenándose a -80°C.

El grupo control está constituido por pacientes que ingresaron para intervención quirúrgica inmediata por sospecha diagnóstica de patología apendicular aguda, previo consentimiento informado para la incorporación de la Historia Clínica en un proyecto de investigación. Para la obtención de las muestras sanguíneas se procedió de la misma forma que en el grupo de pacientes con adenocarcinoma de colon. Tras la realización de la apendicectomía, la pieza quirúrgica se remitía al Servicio de Anatomía Patológica, previa fijación en formaldehído 3,7-4,0% tamponado a pH=7 y estabilizado con metanol DC.

### Procesamiento de las muestras

A partir de las muestras de suero se realizó el aislamiento del RNA, para la posterior realización de la técnica cuantitativa de la reacción en cadena de polimerasa a tiempo real (qRT-PCR), siempre siguiendo las normas de procesamiento del fabricante. El proceso de aislamiento del microRNA-21 y microRNA-16 se realizó mediante "High Pure miRNA Isolation" Kit-Roche Diagnostics SL -España- (versión Julio de 2009). Para la obtención de los DNA complementarios de microRNA-21 y microRNA-16 (retrotranscripción) se empleó el Kit de síntesis cDNA Strand First Transcriptor-Roche Diagnostics SL, España (versión Abril de 2007). Como *primers* específicos para la retrotranscripción inversa se emplearon los kits Taqman® microRNA Assay miR-21 y miR-16, TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin (Germany). Para la cuantificación de los microRNAs se realizó la amplificación mediante PCR en LightCycler® 2.0 Roche Diagnostics SL, España, utilizando las sondas de amplificación incluidas en los kits Taqman® microRNA Assay.

### Análisis de la expresión de los microRNAs y Análisis estadístico

Los valores absolutos de los Ct según las curvas de amplificación de cada microRNA, así como el análisis de la expresión genética, que determina la expresión del microRNA-21 respecto al microRNA de control (microRNA-16), se estimó siguiendo la metodología propuesta por Livak y Schmittgen (Methods 2001).

$$\text{Expresión} = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct \text{ muestra} - Ct \text{ housekeeping})} = 2^{-(Ct \text{ miR21} - Ct \text{ miR16})}$$

Los parámetros a evaluar se dividieron en tres categorías: **1) Parámetros clínicos:** sexo, edad, clínica de presentación, localización tumoral, tratamiento neoadyuvante, complicaciones postquirúrgicas, complicaciones médicas, tratamiento adyuvante, recidiva locorregional, enfermedad a distancia, tiempo libre de enfermedad, mortalidad y periodo de supervivencia; **2) Parámetros analíticos:** leucocitos totales, hemoglobina, hematocrito, plaquetas, actividad de protrombina, glucosa, urea, creatinina, antígeno carcinoembrionario, microRNA caso en suero y microRNA control en suero; **3) Parámetros anatomopatológicos:** tamaño tumoral, afectación neoplásica circunferencial, adenopatías aisladas, adenopatías

metastásicas, estadio TNM, necrosis, ulceración, diferenciación tumoral, diferenciación mucinosa y bordes quirúrgicos afectos; grado de afectación apendicular en pacientes del grupo control.

El análisis estadístico del estudio se llevó a cabo mediante el programa estadístico PASW 18.0 (SPSS Inc, Chicago). Se seleccionó un riesgo alfa del 5% ( $p < 0,05$ ) en todos los contrastes. Los contrastes entre variables cuantitativas y cualitativas (niveles de expresión genética en relación a parámetros anatomopatológicos) se llevaron a cabo mediante pruebas no paramétricas para comparación de dos grupos (U de Mann-Whitney) y más de dos grupos (H de Kruskal-Wallis). En las correlaciones entre variables cuantitativas (correlaciones de los niveles de expresión génica con parámetros analíticos) se empleó la correlación no paramétrica de Spearman (Rho).

## RESULTADOS

Para constituir el grupo estudio se incluyeron un total de 102 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma colorrectal, de los cuales el 53,9% de los pacientes fueron varones, siendo la edad media de  $71,6 \pm 10,2$  años. Basándose en la clasificación pTNM, los pacientes se clasificaron como estadio I (15,7%), estadio IIA (34,3%), estadio IIC (1%), estadio IIIB (17,6%), estadio IIIC (14,7%) y estadio IV (16,7%). Teniendo en cuenta el estadio tumoral, las recidivas tumorales fueron más frecuentes en el estadio IV, seguido de los estadios IIA, IIIB, IIIC y IIC; al igual que ocurrió con la tasa de recidiva, la mayor tasa de mortalidad se dio en el estadio IV, seguido de los estadios IIIB, IIIC, IIA, IIC y I. Para constituir el grupo control se incluyeron un total de 62 pacientes con diagnóstico de "apendicitis aguda", de los cuales el 66,1% de los pacientes fueron varones, siendo la edad media de  $26,2 \pm 14,8$  años.

En el proceso protocolizado de recogida de muestras para la determinación de los microRNAs (miR-21 y miR-16) en suero de pacientes con diagnóstico de cáncer colorrectal, se recogieron los valores de los Ct según las curvas de amplificación de cada microRNA. El análisis de la expresión genética se estimó siguiendo la metodología propuesta por Livak y Schmittgen (Methods 2001). La distribución de la expresión de los microRNAs fue asimétrica (media geométrica de 1,17) distribuyéndose de forma normal los valores transformados en logaritmos (Tabla I).

Los resultados obtenidos en la comparación de la expresión del microRNA-21 fue mayor en los pacientes con cáncer colorrectal que en los pacientes del grupo control (Figura 1), siendo el área bajo la curva de 0,603 (intervalo de confianza 0,515–0,691) (Figura 2). La expresión sérica de miR-21 en pacientes con diagnóstico de cáncer de colon fue mayor respecto a los pacientes con diagnóstico de cáncer de recto, relacio-

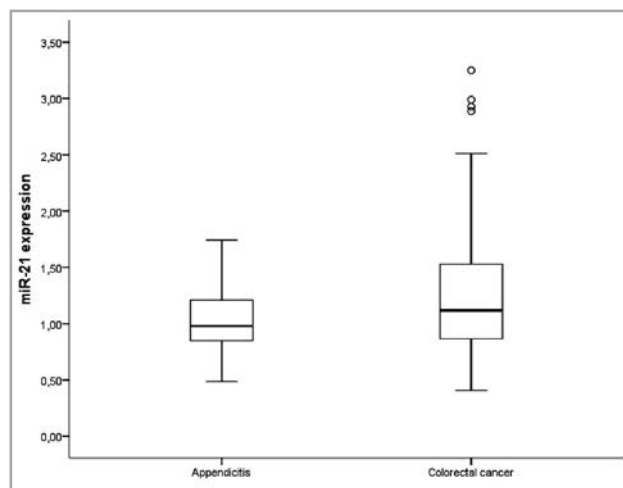


Figura 1.- Comparación de la expresión génica entre cáncer colorrectal y apendicitis.

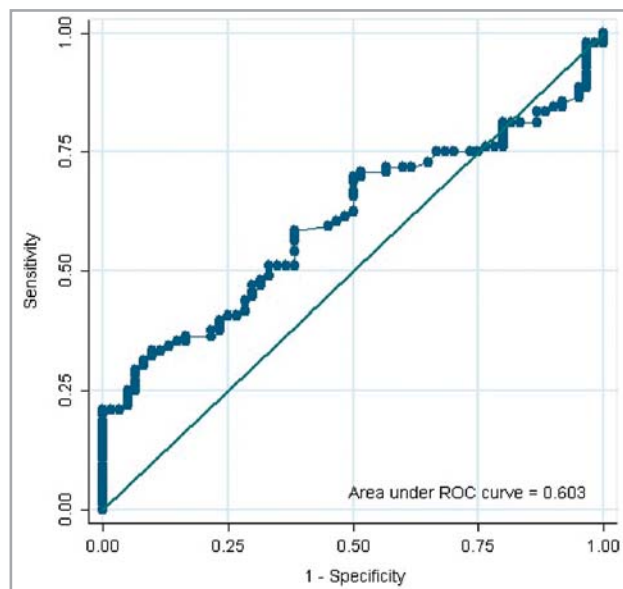


Figura 2.- Curva ROC de la expresión de microRNA-21 entre cáncer colorrectal y apendicitis.

nándose de forma estadísticamente significativa la expresión del miR-21 con la recidiva local y con la mortalidad, de manera inversa.

Tabla I

### NIVELES ABSOLUTOS Y EXPRESIÓN GENÉTICA DE MICRORNA-21 Y MICRORNA-16

		MEDIA (DE)	MEDIANA	P25 – P75	RANGO
Niveles absolutos	miR-21	25,0 (1,01)	25,0	24,3 – 25,7	23,1 – 27,6
	miR-16	25,2 (1,12)	25,2	24,2 – 26,0	22,9 – 27,3
Expresión genética ( $p=0,08$ )	Global	1,30 (0,63)	1,12	0,86 – 1,54	0,41 – 3,25
	Colon	1,38 (0,68)	1,20	0,82 – 1,71	0,48 – 3,25
	Recto	1,16 (0,50)	1,06	0,87 – 1,20	0,41 – 2,36

En el análisis univariante, la expresión del miR-21 se relaciona de forma estadísticamente significativa con la recidiva local ( $p=0,025$ ) y con la mortalidad ( $p=0,029$ ). En el análisis multivariante se identificaron como factores pronósticos independientes de mortalidad la edad, el estadio tumoral, los niveles de CEA y la expresión miR-21. Los pacientes mayores de 65 años mostraron un riesgo de fallecimiento 3,36 mayor que los pacientes más jóvenes (categoría de referencia). Los pacientes con estadios más avanzados presentaron un riesgo de óbito 3,71 veces mayor que los de estadios más precoces. Por cada incremento en 1 ng/mL del CEA se produce un incremento en el riesgo de muerte de 1,019 veces. La expresión relativa del miR-21 aumentado ( $>1$ ) se asoció a una reducción del riesgo de morir del 50%. En el análisis multivariante también se puso de manifiesto que las expresiones mayores (sobrexpresiones) de miR-21 se relacionaban con una mejor supervivencia.

Se identificaron como factores pronósticos independientes de progresión de la enfermedad el estadio tumoral, el CEA y la expresión miR-21. Los pacientes con estadios más avanzados presentaron un riesgo de recidiva 4,02 veces mayor que los de estadios más precoces. Por cada incremento en 1 ng/mL del CEA se produce un incremento en la recidiva de 1,010 veces. La expresión relativa del miR-21 aumentada ( $>1$ ) se asoció a una reducción del riesgo de recidiva del 51%.

## DISCUSIÓN

Un gran número de investigaciones tienen como objetivo identificar métodos de cribado no invasivos enfocados hacia el diagnóstico temprano de diferentes enfermedades, tales como pruebas hematológicas o el análisis del DNA en heces.<sup>6</sup> La utilidad diagnóstica del miR-21 sérico se ha determinado en diferentes tipos de neoplasias, como en la diferenciación del cáncer de pulmón respecto al nódulo pulmonar solitario.<sup>7</sup> En el carcinoma no microcítico de pulmón, el incremento de la expresión sérica de miR-21 resultó significativo respecto a los controles sanos, relacionándose los niveles altos con la estadificación TNM y con las metástasis ganglionares.<sup>8,9</sup>

En el presente estudio, sobre 102 casos de cáncer colorrectal, se ha llevado a cabo la determinación en suero de miR-21 mediante qRT-PCR, comparando los resultados con un grupo control compuesto por pacientes diagnosticados de apendicitis aguda, utilizando en ambos grupos el miR-16 como microRNA normalizador. De acuerdo con los resultados descritos en estudios previos,<sup>10-13</sup> los resultados obtenidos en la comparación de ambos grupos fue estadísticamente significativo ( $p<0,001$ ), siendo el área bajo la curva de 0,603 (intervalo de confianza 0,515–0,691) (Tabla II). Según la curva ROC, estableciendo el punto de corte en 0,688 la sensibilidad de la prueba alcanzaría el 88,5%, a expensas de una muy baja especificidad (5%), la cual aumentaría al 86,7% para un punto de corte 1,343, en detrimento de una sensibilidad de 34,4% (Figura 2).

Tabla II

### COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE CÁNCER COLORRECTAL Y APENDICITIS.

	MEDIA (DE)	MED (IQR)
Cáncer colorrectal	1,30 (0,63)	1,12 (0,68)
Apendicitis	1,03 (0,67)	0,98 (0,36)

$p<0,001$

A pesar de que, en el presente estudio, la determinación del miR-21 en suero ha demostrado un "rendimiento diagnóstico bajo" para el cáncer colorrectal, existen posibles connotaciones que podrían explicar los resultados obtenidos. Los microRNAs pueden ser mediadores de la carcinogénesis dependiente de la inflamación, como es el caso de miR-21 y de miR-155,<sup>14</sup> además de haberse evidenciado la existencia de una relación entre el miR-21 y la expresión de las interleucinas IL-6 e IL-12a,<sup>15</sup> así como la modificación de las concentraciones de los microRNAs en enfermedades inflamatorias y en estados sépticos.<sup>16,17</sup> A partir del estímulo desencadenante de la cascada inflamatoria, se altera la expresión de los microRNAs de forma que, algunos de ellos pueden desplegar tanto actividades oncogénicas como supresoras de tumores.<sup>14</sup> Resultados funcionales que concuerdan con los obtenidos por Bihrer et al., en el sentido de que la expresión de miR-21 está claramente relacionada con la actividad necroinflamatoria; aunque en su estudio no pudiera llegar a discernir entre pacientes con hepatitis por el virus C y pacientes con hepatocarcinoma derivado de la infección por virus C.<sup>18</sup> Según lo expuesto, la participación del miR-21 en los procesos inflamatorios tal y como se ha descrito en literatura médica<sup>16-17</sup>, así como las modificaciones vasculares secundarias al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, podrían apuntar a que la elección del grupo control, pacientes diagnosticados de apendicitis aguda, provocase per se un sesgo en la comparativa de las expresiones del miR-21. Dado que la sobreexpresión de miR-21 en patologías inflamatorias bien podría interpolarse a la apendicitis aguda, lo que presupondría una situación orgánica anómala por la concomitancia de unos mecanismos patogénicos específicos que, representando factores extraños e incontrolados para el estudio, podrían dificultar una correcta comparación con los valores expresados en el cáncer colorrectal.

La elección de pacientes con apendicitis aguda, como grupo control, se basó en la facilidad para la obtención de muestras, séricas y quirúrgicas, de una patología cólica benigna que resultaba inédita en la literatura médica sobre este campo de investigación. Una repetición del estudio estableciendo como grupo control a pacientes sanos, muy probablemente otorgase al miR-21 una capacidad discriminativa mayor con respecto al cáncer colorrectal.

## CONCLUSIONES

El presente estudio, según la estadística comparativa de los datos, demostró que la expresión sérica del microRNA-21 era significativamente superior ( $p < 0,001$ ) en los pacientes con cáncer colorrectal que en los pacientes del grupo control, constatándose unos valores de AUC=0,603 en la correspondiente curva ROC, demostrando la potencial utilidad como marcador diagnóstico.

También se ha demostrado que la expresión del microRNA-21 se relacionó de modo inverso estadísticamente significativo tanto con la recidiva local ( $p=0,025$ ) como con la mortalidad ( $p=0,029$ ). La expresión relativa del microRNA-21 aumentada ( $>1$ ) mostró una reducción del riesgo de recidiva del 51%, así como una reducción del riesgo de muerte del 50%; tanto en el análisis univariante como en el análisis multivariante se objetivó que las sobreexpresiones de microRNA-21 se relacionaban con una supervivencia mayor. Datos que ponen de manifiesto su utilidad como marcador pronóstico.

Es preciso continuar la investigación sobre qué microRNAs séricos resultan los más apropiados para lograr una mayor precisión en la formulación de los pronósticos. Proceso investiga-

dor que, insoslayablemente, deberá contemplar una estricta estandarización en el proceso de extracción y cuantificación de los microRNAs, expresada en la unificación de los métodos de determinación, en la selección de los controles internos y en los métodos de normalización de la expresión genética.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Tang JT, Fang JY. MicroRNA regulatory network in human colorectal cancer. *Mini Rev Med Chem* 2009;9:921-6.
2. Menéndez P, Villarejo P, Padilla D, Menéndez JM, Rodríguez Montes JA. MicroRNA-21 y cáncer colorrectal. *Rev Esp de Inv Quirúrgicas* 2011;14(2):115-20.
3. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(30):10513-8.
4. Menéndez P, Villarejo P, Padilla D, Menéndez JM, Rodríguez Montes JA. Diagnostic and prognostic significance of serum microRNAs in colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology* 2013;107(2):217-20.
5. Menéndez P, Villarejo P, Padilla D, Menéndez JM, Rodríguez Montes JA. Implications of the histological determination of microRNAs in the screening, diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology* 2013;108(1):70-3.
6. Tsang JC, Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma/serum. *Pathology* 2007;39(2):197-207.
7. Shen J, Liu Z, Todd NW, Zhang H, Liao J, Yu L, et al. Diagnosis of lung cancer in individuals with solitary pulmonary nodules by plasma microRNA biomarkers. *BMC Cancer* 2011;11:374.
8. Wang ZX, Bian HB, Wang JR, Cheng ZX, Wang KM, De W. Prognostic significance of serum miRNA-21 expression in human non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* 2011;104(7):847-51.
9. Liu XG, Zhu WY, Huang YY, Ma LN, Zhou SQ, Wang YK, et al. High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer. *Med Oncol* 2012;29(2):618-26.
10. Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010;127(1):118-26.
11. Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer. a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 2009;58(10):1375-81.
12. Pu XX, Huang GL, Guo HQ, Guo CC, Li H, Ye S, et al. Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25(10):1674-80.
13. Cheng H, Zhang L, Cogdell DE, Zheng H, Schetter AJ, Nykter M, et al. Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PLoS One* 2011;6(3):e17745.
14. Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer. interleaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* 2010;31(1):37-49.
15. Wang P, Zou F, Zhang X, Li H, Dulak A, Tomko RJ Jr, et al. microRNA-21 negatively regulates Cdc25A and cell cycle progression in colon cancer cells. *Cancer Res* 2009;69(20):8157-65.
16. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(30):10513-8.
17. Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sültmann H. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer* 2010;9:306.
18. Bihrer V, Waidmann O, Friedrich-Rust M, Forestier N, Susser S, Haupenthal J, et al. Serum microRNA-21 as marker for necroinflammation in hepatitis C patients with and without hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2011;6(10):e26971.