

Original

MINDIN induce modificaciones de la expresión génica de las integrinas en células osteoblásticas y osteocíticas

Luis Álvarez-Carrión^{1,3}, Irene Gutiérrez-Rojas¹, Juan A. Ardura^{2,3}, Verónica Alonso^{1,3}

¹Laboratorio de Cáncer y Metástasis Óseas (Unidad de Metástasis). Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Facultad de Medicina. Universidad CEU San Pablo. CEU Universities. Boadilla del Monte, Madrid. ²Laboratorio de Fisiopatología Ósea. Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA). Facultad de Medicina. Universidad San Pablo-CEU. Boadilla del Monte, Madrid. ³Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Facultad de Medicina. Universidad San Pablo-CEU. Boadilla del Monte, Madrid

Resumen

El hueso es un órgano dinámico sometido a constante remodelación, proceso que depende de la actividad coordinada de osteoblastos, osteoclastos y osteocitos. El hueso también es un sitio común de metástasis de tumores sólidos, como ocurre en el cáncer de próstata, cuya metástasis ósea se asocia con un pronóstico grave. Además, se ha propuesto que antes del establecimiento de metástasis, los tumores inducen cambios en órganos distantes, promoviendo la formación de nichos premetastásicos que favorecen la implantación tumoral. MINDIN, una proteína de matriz extracelular ha sido identificada como un biomarcador potencial del cáncer de próstata y se encuentra altamente expresada en pacientes con metástasis óseas. Esta proteína puede modificar tanto a las células tumorales como al entorno óseo, y se ha sugerido que pueda favorecer el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica. MINDIN también puede actuar como un ligando para integrinas, una familia de receptores transmembrana clave en la regulación de adhesión, señalización y migración de células tumorales. Basándonos en estas observaciones, hipotetizamos que MINDIN puede promover la formación del nicho premetastásico óseo mediante la modificación de expresión de integrinas específicas en células tumorales y óseas. Se empleó un modelo murino tumoral para estudiar la influencia de MINDIN en la expresión de integrinas y su posible implicación en la formación del nicho premetastásico óseo, así como experimentación en modelos *in vitro* donde se emplearon líneas celulares osteoblásticas (MC3T3-E1), osteocíticas (MLO-Y4) y tumorales prostáticas (TRAMP-C1). En el modelo experimental animal previamente desarrollado por nuestro grupo donde se estableció tumor primario con ausencia de metástasis óseas establecidas, se observó un aumento de la expresión génica de la integrina $\beta 6$ tanto en las próstatas como en las tibias de ratones con presencia de tumor, efecto que se revirtió con el silenciamiento de MINDIN. Estos datos fueron confirmados en nuestro modelo experimental *in vitro*, donde las células TRAMP-C1 estimuladas con MINDIN mostraron un aumento en la expresión de la integrina $\beta 6$, mientras que el silenciamiento de MINDIN redujo significativamente su expresión. En células osteoblásticas (MC3T3-E1), MINDIN también indujo sobreexpresión de la integrina $\beta 6$. En contraste, en las células osteocíticas (MLO-Y4), MINDIN no indujo sobreexpresión de $\beta 6$, sino que incrementó la expresión de la integrina $\alpha 2$. Estos resultados sugieren una posible especificidad celular en la interacción entre MINDIN e integrinas, donde MINDIN podría favorecer la creación de nichos premetastásicos en hueso mediante la sobreexpresión de la integrina $\beta 6$.

Palabras clave:
MINDIN. Integrinas.
Cáncer de próstata.
Metástasis óseas.

Recibido: 21/07/2025 • Aceptado: 16/12/2025

Juan A. Ardura y Verónica Alonso son autores con el mismo senior estatus.

Agradecimientos: agradecemos el apoyo de la Sociedad Española de Metabolismo Mineral y Óseo (SEIOMM) y de la Fundación Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (FEIOMM) que ha permitido la elaboración del presente manuscrito.

Este trabajo se realizó gracias a la BECA FEIOMM BÁSICA 2023.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

Álvarez-Carrión L, Gutiérrez-Rojas I, Ardura JA, Alonso V. MINDIN induce modificaciones de la expresión génica de las integrinas en células osteoblásticas y osteocíticas. Rev Osteoporos Metab Miner 2026;18(2):47-57

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00086

Correspondencia:

Verónica Alonso Rodríguez. Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA). Facultad de Medicina. Universidad San Pablo-CEU. 28925 Alcorcón, Madrid
e-mail: veronica.alonsoarodriguez@ceu.es

INTRODUCCIÓN

El hueso es un órgano metabólicamente activo que se remodela continuamente a lo largo de nuestra vida. El proceso de remodelado óseo, en el que se acoplan resorción y formación de hueso, sirve para ajustar la arquitectura ósea a las necesidades mecánicas del hueso. Además, el hueso es el principal órgano de almacenamiento de calcio, fósforo y magnesio. Las concentraciones plasmáticas de estos minerales dependen del balance entre la formación y la resorción ósea, regulada por hormonas como la parathormona (PTH), la calcitonina y la 1,25-dihidroxi vitamina D (1). Este proceso se encuentra mediado por osteoblastos y osteoclastos que llevan a cabo formación y resorción ósea de manera coordinada, respectivamente. Además, un tercer tipo de células óseas, los osteocitos, actúan como sensores de estimulación mecánica y son capaces de comunicarse con osteoblastos y osteoclastos modulando su actividad (2,3).

Aunque no todos los tumores sólidos metastatizan al hueso, este representa un órgano diana habitual en la diseminación metastásica de cánceres como el de próstata, mama, pulmón, riñón y tiroides, siendo la aparición de la enfermedad metastásica una grave amenaza en la tasa de supervivencia de pacientes que desarrollan este tipo de tumores (4,5). La metástasis a hueso es una complicación frecuente en fases avanzadas de pacientes con cáncer de próstata, uno de los tumores con mayor mortalidad y morbilidad en países desarrollados (6). Los tumores provocan dos tipos diferentes (aunque no excluyentes) de lesiones esqueléticas. La forma más común, representada por ejemplo por el cáncer de mama, es la lesión osteolítica, asociada a alteración del remodelado óseo ocasionada por el incremento en la actividad osteoclástica y la consiguiente osteólisis (7-10). Por otro lado, existe un segundo tipo de lesiones denominadas osteoblásticas, características por ejemplo del cáncer de próstata, caracterizadas por un incremento en la actividad de los osteoblastos, aumento de osteoide y de la tasa de mineralización (11,12). No obstante, actualmente se reconoce la existencia de un componente resorptivo mediado por los osteoclastos como paso previo para el establecimiento de lesiones osteoblásticas (11,12).

Recientes estudios han descrito cambios prometastásicos en órganos donde más tarde aparecerán metástasis (13). Tales cambios inducen la formación de nichos premetastásicos que favorecen la implantación de células tumorales en ciertos órganos diana (13). La complejidad celular del hueso, así como su continua regulación del metabolismo y remodelado óseo, plantean la posibilidad de que la formación del nicho premetastásico óseo sea consecuencia de una red compleja de modificaciones combinadas o secuenciales de las funciones celulares óseas (14). Evitar las distintas etapas necesarias para que la célula tumoral abandone el tumor primario, migre y se establezca en el mi-

croambiente óseo es una de las principales estrategias para prevenir la diseminación de las metástasis óseas (14). La invasión de células de tumor primario a nichos esqueléticos se asocia con la activación de células óseas que liberan factores de crecimiento y citoquinas, que a su vez promueven el crecimiento del tumor en las metástasis (4). Como resultado se genera el denominado "ciclo vicioso" de las metástasis óseas, que varía la fisiología del hueso y altera el remodelado óseo (4).

MINDIN, también conocida como espondina-2, es una proteína secretada de la matriz extracelular perteneciente a la clase de moléculas que contienen repeticiones de trombospondina de tipo 1. Se ha sugerido recientemente que MINDIN actúa como biomarcador de diagnóstico específico del cáncer de próstata (15,16), encontrándose una mayor concentración de esta proteína en suero de pacientes con cáncer de próstata y metástasis óseas (17). También se ha observado que MINDIN es una proteína altamente expresada en otros tumores, como el cáncer de pulmón (18), hígado (19,20), colorrectal (CRC) (21), gástrico (22), carcinoma renal de células claras (23), ovario (24), mama (25), pancreático (26) y adenocarcinoma de Barrett (27). Aunque la sobreexpresión de MINDIN está significativamente asociada con la progresión de los tumores colorrectales, de próstata y de ovario, utilizándose como predictor de un mal pronóstico de supervivencia, el papel de MINDIN en otros tumores es controvertido debido a la falta de estudios e información (19,20,22,24-32). Cabe destacar que MINDIN es capaz de inducir en las células tumorales prostáticas proliferación, migración y la adquisición de características moleculares propias del hueso, proceso conocido como osteomimetismo (33,34). Además, MINDIN es capaz de modificar la expresión de marcadores osteoblásticos y osteoclásticos del entorno óseo, observándose un incremento de la expresión génica de la *fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP)* y *osterix*, así como un incremento de la expresión proteica de TRAP. Estos cambios han sugerido que MINDIN podría favorecer la progresión tumoral y la formación de metástasis óseas (33,34).

Las integrinas son receptores transmembrana heterodiméricos formados por subunidades alfa y beta que funcionan como moléculas de anclaje y señalización celular (35). Existen 18 subunidades alfa y 8 subunidades beta, dando lugar a al menos 24 heterodímeros conocidos de integrinas distintos con diferentes funciones y actividades de unión a ligandos. Las integrinas actúan como moléculas de anclaje mediando la adhesión del citoesqueleto celular a la matriz extracelular (MEC). También actúan como moléculas de señalización bidireccional al mediar en la señalización desde el exterior al interior de la célula y *viceversa*, controlando así una serie de funciones celulares vitales como la adhesión, la polaridad, la diferenciación, la migración y la división celular (36-38). En estados patológicos, la señalización defectuosa de las integrinas puede alte-

rar estas funciones y dar lugar a división, migración y adhesión celular anómala, características propias del cáncer y la metástasis (39-43). Se ha observado que durante los procesos tumorales se produce una desregulación de la expresión de integrinas, en algunos casos mostrando sobreexpresión ($\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 6$) y en otros disminución ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$) (39-44) (Tabla I). Estudios previos han demostrado que la proteína MINDIN puede interactuar con las integrinas en neutrófilos y que dicha interacción MINDIN-integrina es fundamental para el reclutamiento de células inflamatorias en algunos modelos *in vivo* (45,46). Sin embargo, se desconoce si MINDIN puede alterar el perfil de expresión de integrinas en células tumorales y óseas para promover procesos de progresión tumoral y metástasis óseas (45,46).

Tabla I. Resumen de las subunidades de integrinas implicadas en el desarrollo tumoral y metástasis

Subunidad de integrina α/β	Expresión desregulada	Referencias
$\alpha 2$	Expresión disminuida en adenocarcinoma prostático y aumentada en metástasis óseas	47-50
$\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$	Expresión disminuida en adenocarcinomas prostáticos	47,48
$\alpha 6$	Sobreexpresada en metástasis óseas	48,51,52
$\beta 1$	Expresión incrementada en adenocarcinoma de próstata	53,54
$\beta 3$	Expresada en adenocarcinoma de próstata y lesiones metastásicas; ausente en células normales	53,54
$\beta 6$	Expresada en adenocarcinoma prostático y lesiones metastásicas óseas; ausente en células normales	55,56

Basándonos en todas estas observaciones, hipotetizamos que MINDIN puede modificar el perfil de expresión de integrinas en células óseas y tumorales de próstata para potencialmente favorecer el desarrollo de las metástasis en hueso. Para ello, en el presente trabajo estudiamos los efectos de la proteína protumoral MINDIN sobre el perfil de expresión génica en células óseas (osteoblastos y osteocitos) y células tumorales de próstata de aquellas integrinas que son clave en el desarrollo de metástasis en hueso.

MATERIALES Y MÉTODOS

MODELO ANIMAL

Se utilizaron ratones macho C57BL/6 de tres meses de edad (Charles River, Wilmington, MA) mantenidos en

jaulas bajo condiciones estándar: temperatura ambiente de $20 \pm 0,5$ °C, humedad relativa del 55 ± 5 % y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h. Los animales permanecieron sin restricción de movimiento y recibieron una dieta estándar de pellets (Teklad Global 18 % Protein Rodent Diet, Envigo, Madison, WI) y agua de grifo *ad libitum*.

La intervención quirúrgica se realizó en condiciones asépticas con los ratones anestesiados mediante inhalación de isoflurano y administración de xilacina (10 mg/kg) y ketamina (25 mg/kg). A través de una incisión en la línea media abdominal inferior, se inyectaron 50 μ l en el lóbulo prostático posterior derecho de vehículo (PBS), 5×10^5 células TRAMP-C1 transfectadas con siRNAs scrambled o 5×10^5 células TRAMP-C1 transfectadas con tres siRNAs dirigidos contra MINDIN (s97640, s97638, s87252; Life Technologies, Paisley, Reino Unido). Se consideró una inyección técnicamente correcta cuando la ampolla quedaba localizada dentro del lóbulo prostático. Tras la intervención, la cavidad abdominal, el músculo y la piel se cerraron con grapas quirúrgicas.

Un mes después, se extrajeron los tumores primarios de próstata y las tibias, que se almacenaron en Trizol (Thermo Scientific) para la posterior extracción de ARN y su análisis mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad San Pablo CEU.

CULTIVOS CELULARES

Para los ensayos del presente trabajo se cultivaron a 37 °C con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad y con medios suplementados con 1 % de estreptomicina/penicilina las siguientes líneas celulares: células mesenquimales preosteoblásticas de ratón (MC3T3-E1 subclón 4, ATCC, CRL-2593). Estas células fueron cultivadas con medio alfa MEM sin ácido ascórbico ("minimum essential medium", Thermofisher, A1049001) suplementado con 10 % FBS (suro fetal bovino) y 1 % L-glutamina. Células osteocíticas murinas MLO-Y4 (generosamente cedidas por Lynda Bonewald), cultivadas con medio alfa MEM (Thermofisher, 22571038) suplementado con 2,5 % FBS y 2,5 % de suero de ternero ("calf serum" [CS], Thermofisher, 16010159). Utilizamos la línea de adenocarcinoma prostática de ratón TRAMP-C1 (ATCC® CRL-2730 TM) cultivadas con medio DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium", Thermofisher, 11965092) suplementado con 10 % FBS y 1 % L-glutamina.

Las células se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos y a las 24 horas se estimularon con MINDIN (5 ng/mL) durante 6 o 24 horas. Tras la estimulación, cada muestra se recogió en Trizol para la posterior extracción de ARN total y análisis por PCR cuantitativa en tiempo real.

SILENCIAMIENTO CELULAR

Las células TRAMP-C1 se silenciaron con una mezcla de tres siRNA (cada uno a 20 nM)

dirigidos a diferentes secuencias codificantes de *MINDIN* de ratón (s97640; s97638; s87252) (Life Technologies, Paisley, Reino Unido) utilizando lipofectamina RNAiMax (Life Technologies) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó un silenciador "scrambled" no dirigido a ninguna secuencia concreta del genoma (siRNA-A de control, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) como control negativo para verificar la especificidad de los cambios dependientes de los siRNAs de *MINDIN* en los diferentes parámetros evaluados. La eficacia del silenciamiento de *MINDIN*, se evaluó mediante PCR en tiempo real: a las 24 horas fue $0,05 \pm 0,0060$ vs. $1 \pm 0,03$; $p < 0,0001$; a las 48 horas $0,15 \pm 0,1$ vs. $1 \pm 0,07$; $p < 0,001$ y finalmente, tras 15 días fue $0,4 \pm 0,13$ vs. $1 \pm 0,01$; $p < 0,001$.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (PCR)

El ARN total se aisló mediante un procedimiento estándar (Trizol, Life Technologies), y 2 µg de ARN de cada muestra se retrotranscribieron con un kit de retrotranscripción de alta capacidad de cDNA ("High capacity RNA to cDNA Kit", Thermofisher, 4387406) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El estudio de expresión por PCR en tiempo real se realizó en base a la emisión de fluorescencia del fluorocromo SYBR Green premix ex Taq (Takara, Otsu, Japón), utilizando un sistema ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). El número de copias de ARNm se calculó para cada muestra utilizando el valor del ciclo umbral (Ct). Los genes *18S* o β -*ACTINA* (usado como control constitutivo de expresión) se amplificaron en paralelo como genes control, permitiendo el cálculo del número de pasos de amplificación requeridos para alcanzar una intensidad arbitraria Ct. La expresión relativa de los genes se definió como la expresión relativa en comparación con el control calculada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ tratamiento - ΔCt control y $\Delta Ct = Ct$ gen problema - Ct gen control (*18S*/ β -*ACTINA*). La expresión génica de muestras de animales se representó como puntos de datos individuales calculando $2^{-\Delta Ct}$, como se ha descrito previamente (57). La especificidad de cada amplicón se confirmó como la presencia de un único pico en la curva de disociación para cada reacción de qPCR.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se encuentran expresados como medias $\pm$ error estándar. Se analizó la distribución de los datos

y dado que no se ajustaban a una distribución normal, las diferencias entre los grupos experimentales se evaluaron mediante análisis de la varianza no paramétrico (Kruskal-Wallis). La determinación de las posibles diferencias entre los grupos experimentales se realizó mediante las pruebas de Dunn o de Mann Whitney. Para realizar los análisis estadísticos, así como para detectar *outliers*, se utilizó el programa GraphPad Prism. En la exclusión de los *outliers* se siguió siguiendo los criterios estándar basados en la desviación típica atendiendo al análisis del programa. Se consideró $p < 0,05$ como valor estadísticamente significativo.

RESULTADOS

LA EXPRESIÓN DE MINDIN EN TUMORES PRIMARIOS DE PRÓSTATA MODIFICA LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS INTEGRINAS EN PRÓSTATAS Y TIBIAS DE RATONES

En este trabajo, caracterizamos los patrones de expresión génica de integrinas que podrían favorecer la metástasis de células tumorales de próstata en el microambiente óseo. Utilizamos un modelo de ratón C57BL/6, que recapitula la progresión del cáncer de próstata, de hiperplasia a neoplasia intraepitelial prostática para potencialmente metastatizar a ganglios linfáticos, pulmones y hueso. En este modelo, previamente desarrollado, 1 mes tras la inyección ortotópica de células de cáncer de próstata TRAMP-C1 se produjo la sobreexpresión del marcador tumoral *PSCA* (1966 ± 834 vs. $1 \pm 0,4$; $p = 0,024$) y de *MINDIN* ($714,25 \pm 348,32$ vs. $1 \pm 0,3$; $p < 0,0001$) (34), en el grupo tumoral en comparación con el control, indicando el establecimiento del tumor primario en esta temporalidad. Los tumores de próstata generados por células TRAMP-C1 silenciadas con *MINDIN* mostraron una disminución drástica de la expresión de *MINDIN* ($28,57 \pm 16,6$ vs. $714,25 \pm 348,32$; $p = 0,0012$) sin afectar a la expresión del marcador de carga tumoral *PSCA* ($1136,3 \pm 315,3$ vs. 1966 ± 834 ; $p < 0,43$), en comparación con el grupo tumoral que expresa *MINDIN* (33,34). En este modelo, al no observarse cambios en la expresión de *PSCA* ni de *MINDIN* en las tibias, podemos decir que no se ha producido metástasis de tumor al hueso al tiempo estudiado (33).

No obstante, sí habíamos observado previamente cambios en los huesos del modelo reflejados en un incremento en la expresión génica del marcador de resorción ósea *TRAP* y modificación de la microarquitectura ósea; cambios que se revirtieron cuando *MINDIN* fue silenciada en el tumor primario (33).

Dado que se han descrito alteraciones en los niveles de integrinas en la progresión tumoral, siendo posibles moléculas a través de las cuales *MINDIN* podrían estar ejerciendo sus acciones realizamos un estudio de

perfil de integrinas. En este modelo observamos que, de las distintas integrinas clave en metástasis óseas estudiadas (Figs. 1A-E y 2A-E), el establecimiento de tumores prostáticos con sobreexpresión de *MINDIN* indujo únicamente incremento de la expresión génica de la *integrina* $\beta 6$ en los tumores primarios de próstata (Fig. 1E) y también en las tibias de ratones (Fig. 2E). Los cambios observados se revirtieron cuando *MINDIN* fue silenciada en el tumor primario de próstata (Figs. 1E y 2E). Estos resultados indican que *MINDIN* es capaz de modular la expresión de la *integrina* $\beta 6$ tanto en el tumor primario como en el hueso, donde aún no parece haberse establecido el tumor. Esto podría sugerir que la modificación del perfil de integrinas podría considerarse como un cambio que promueva la formación del nicho premetastásico óseo.

MINDIN INDUCE MODIFICACIONES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS INTEGRINAS EN CÉLULAS TUMORALES PROSTÁTICAS

Se ha descrito que *MINDIN* aumenta la adhesión de diferentes tipos de células a la matriz extracelular, incluidos neutrófilos, macrófagos, linfocitos o células tumorales prostáticas (46,58). Así pues, dado que las integrinas son proteínas transmembrana clave en la adhesión de las células a la matriz y teniendo en cuenta la modificación de expresión génica observada de *integrina* $\beta 6$ en el tumor primario, nos preguntamos

si la secreción de *MINDIN* por los tumores de próstata podría modificar la expresión de las integrinas para incrementar la adhesión de las células de adenocarcinoma prostático a las superficies óseas. Para ello, usamos células tumorales prostáticas TRAMP-C1 estimuladas con *MINDIN*. Se observó un incremento en la expresión de la *integrina* $\beta 6$ tras la estimulación con *MINDIN* durante 6 o 24 horas (Figs. 3 A-B). Además, se observó que, el silenciamiento de *MINDIN*, durante 24 horas, en las células tumorales TRAMP-C1, ocasionaba una disminución significativa de la *integrina* $\beta 6$ (Fig. 3C). A pesar de que se observa un incremento en los niveles de expresión de la *integrina* $\alpha 2$ tras 24 horas de estimulación con *MINDIN*, dicho incremento no alcanzó significancia estadística ($p = 0,117$).

MINDIN INDUCE MODIFICACIONES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS INTEGRINAS EN CÉLULAS OSTEOLÁSTICAS Y OSTEOCÍTICAS

Con objeto de averiguar si *MINDIN* podía también modificar el perfil de expresión de integrinas en células óseas, analizamos los efectos de *MINDIN* en diferentes células óseas, incluyendo las células osteoblasticas MC3T3-E1 y las células osteocíticas MLO-Y4. En las células osteoblasticas MC3T3 se observó un aumento de la expresión génica de la *integrina* $\beta 6$ tanto a 6 como a 24 horas de estimulación con *MINDIN* (Figs. 4A-B).

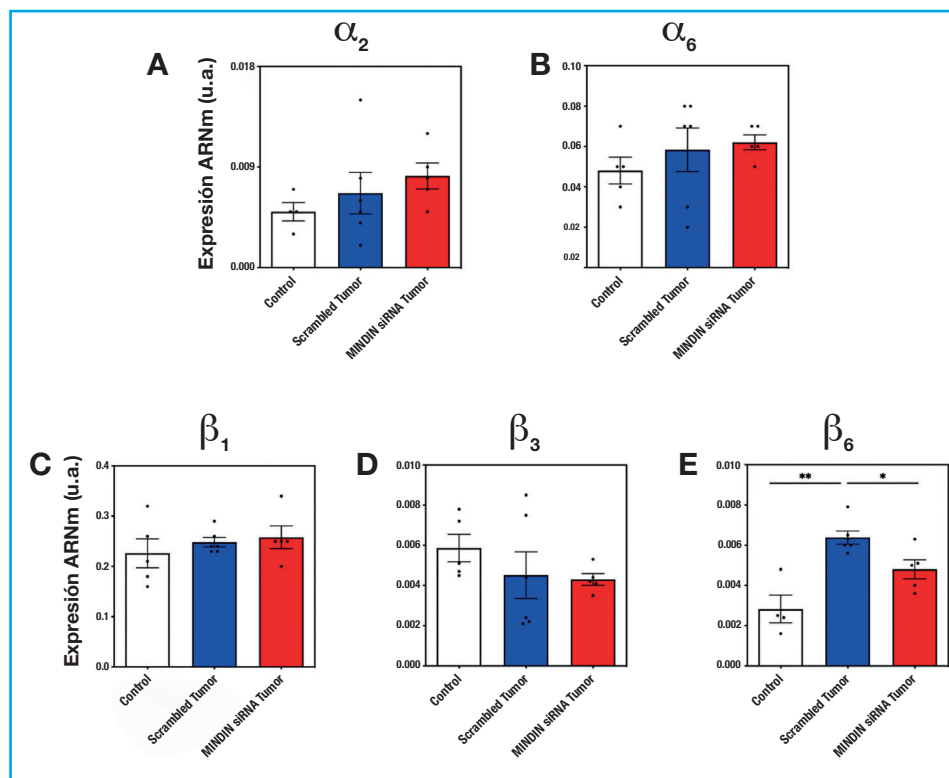


Figura 1. *MINDIN* induce la sobreexpresión de la *integrina* $\beta 6$ en tumores de próstata en un modelo *in vivo* de ratón. Expresión de ARNm de las integrinas (A) $\alpha 2$, (B) $\alpha 6$, (C) $\beta 1$, (D) $\beta 3$ y (E) $\beta 6$ en próstatas de ratones evaluadas mediante PCR en tiempo real. Los datos se representan como la media $\pm$ SEM ($n = 4-6$ por grupo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Las muestras utilizadas son muestras de un modelo animal desarrollado y publicado previamente (33,34). Se usó como control endógeno el gen *18S*.

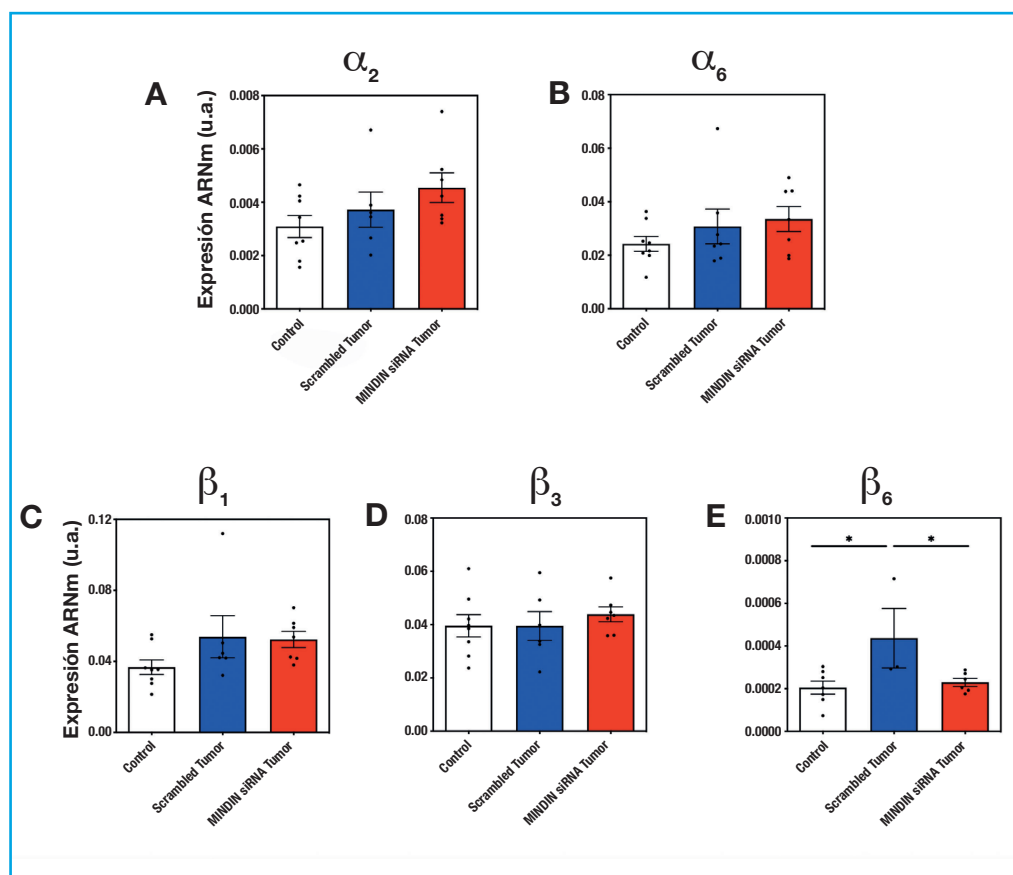


Figura 2. MINDIN induce la sobreexpresión de la *integrina* β_6 en tibias de ratones con tumor de próstata. Expresión de ARNm de las integrinas (A) α_2 , (B) α_6 , (C) β_1 , (D) β_3 y (E) β_6 en tibias de ratones evaluadas mediante PCR en tiempo real. Los datos se representan como la media $\pm$ SEM ($n = 3-7$ por grupo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Las muestras utilizadas son muestras de un modelo animal desarrollado y publicado previamente (33,34). Se usó como control endógeno el gen 18S (33,34).

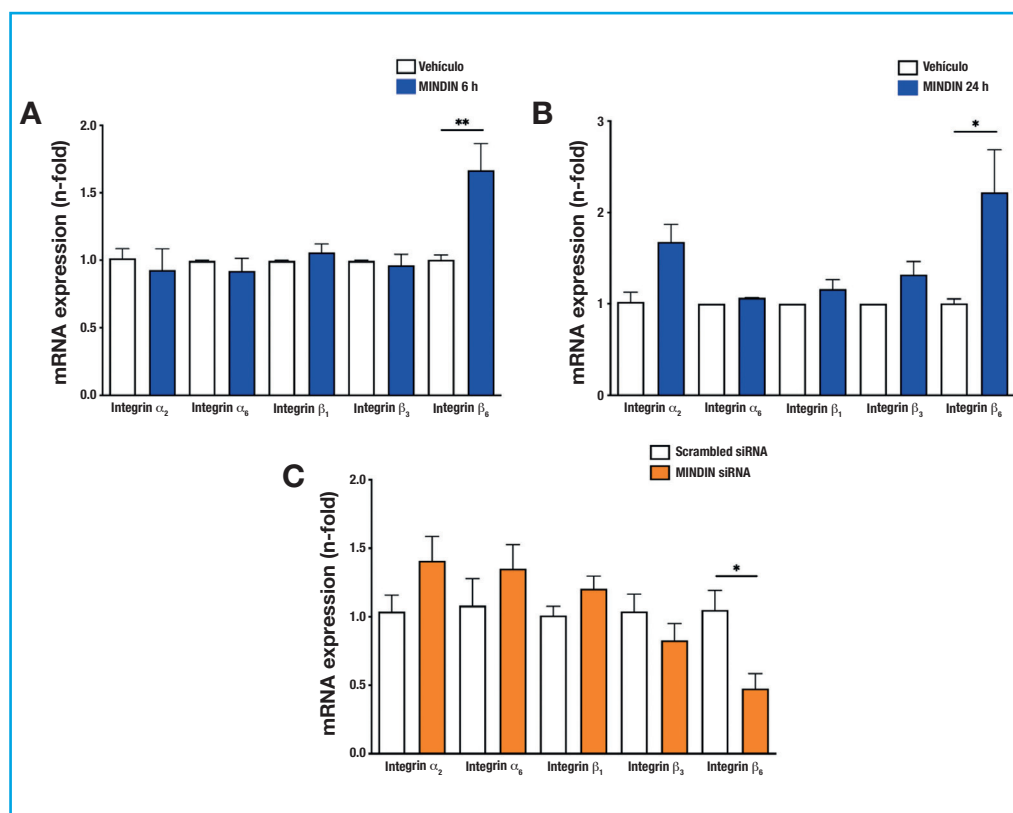


Figura 3. MINDIN induce la sobreexpresión de la *integrina* β_6 en células tumorales prostáticas. Expresión de ARNm de las integrinas α_2 , α_6 , β_1 , β_3 y β_6 en células tumorales prostáticas TRAMP-C1 estimuladas con MINDIN (A) 6 h, (B) 24 o (C) con MINDIN silenciada evaluadas mediante PCR en tiempo real. Los datos se representan como la media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes por triplicado. * $p < 0,05$ frente al control; ** $p < 0,01$ frente al control. Se usó como control endógeno el gen de la β -ACTINA.

Sin embargo, en las células MLOY4 no se observó un incremento de la *integrina* $\beta 6$ ($p = 0,1$) tras 6 horas de estimulación con MINDIN, si no que se produjo un incremento de la *integrina* $\alpha 2$. Estos datos sugieren que dependiendo de del tipo celular diana, MINDIN podría modificar la expresión de diferentes integrinas (Figs. 4B-C).

En su conjunto los datos del presente trabajo indican que MINDIN es capaz de modificar el perfil de transcripción, tanto en células óseas como tumorales, de algunas integrinas relacionadas con la progresión tumoral y el establecimiento de metástasis.

DISCUSIÓN

Las metástasis óseas son dolorosas, difíciles de curar y con un bajo pronóstico de supervivencia. Los tumores primarios crean nichos premetastásicos favorables a las células tumorales en órganos secundarios que derivan posteriormente en el desarrollo de metástasis (59). Además, en la fase inicial de la formación del nicho premetastásico, las células tumorales primarias producen diversos factores solubles para desencadenar la formación de un nicho premetastásico inmaduro (59). Por lo tanto, es clave identificar los factores que regulan las interacciones tumor-hueso e incrementar nuestro conocimiento en los mecanismos que los regulan para desarrollar nuevos enfoques terapéuticos. En este trabajo identificamos a

MINDIN, proteína de matriz extracelular secretada por tumores de próstata, como un factor que puede inducir y modular la expresión génica de integrinas en el tumor primario y en el hueso. Estos cambios de expresión de integrinas podrían incrementar la adhesión de las células tumorales al hueso y favorecer el desarrollo de metástasis óseas, por lo que podrían ser posibles dianas terapéuticas frente a la progresión del cáncer de próstata.

La desregulación de la expresión génica de *MINDIN* se ha documentado en varios tumores humanos, como el cáncer de próstata (15,16), el cáncer gástrico (60) y el cáncer de ovario (61). Se ha descrito que la expresión de *MINDIN* es mayor en muestras de pacientes con cáncer de próstata más agresivo y peor pronóstico, y aun mayor en aquellos con metástasis óseas (16,17). La evaluación de MINDIN mediante inmunotinción de tumores con diferentes puntuaciones de Gleason reveló que los niveles de MINDIN eran más altos en los individuos con cáncer de próstata con metástasis ósea, seguidos de los individuos sin metástasis ósea, hiperplasia y control (16,17). También se ha demostrado que MINDIN es un ligando para las integrinas, siendo las interacciones MINDIN-integrina críticas para el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y linfocitos T en modelos inflamatorios *in vivo* (46,58). Además, se ha observado que MINDIN regula la expresión de Rho GTPasa tras interactuar con las integrinas $\alpha 4 \beta 1$ y $\alpha 5 \beta 1$, contribuyendo al desarrollo tumoral del carcinoma de colon y el carcinoma hepatocelular (58).

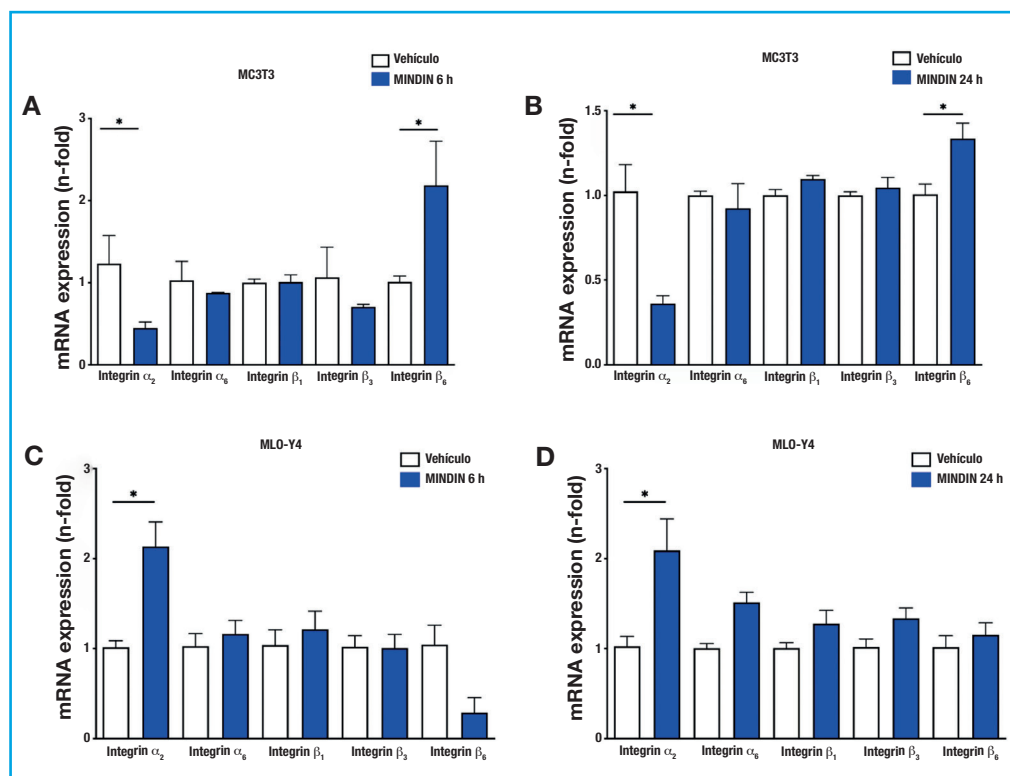


Figura 4. MINDIN induce la sobreexpresión de la *integrina* $\beta 6$ en osteoblastos y la *integrina* $\alpha 2$ en osteocitos. Expresión de ARNm de las *integrinas* $\alpha 2$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 6$ en osteoblastos MC3T3 estimuladas con MINDIN (A) 6 h o (B) 24 y osteocitos estimulados con MINDIN (C) 6 h o (D) 24 h evaluadas mediante PCR en tiempo real. Los datos se representan como la media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes por triplicado. * $p < 0,05$. Se usó como control endógeno el gen de la β -ACTINA.

En ratones macho C57BL/6 de un modelo animal previamente publicado (33,34), observamos que los tumores inducidos por las células tumorales prostáticas TRAMP-C1 provocan cambios en la expresión génica de las integrinas, produciendo un incremento de la expresión de la *integrina* $\beta 6$ dependiente de MINDIN en los tumores primarios de próstata. Aunque no se observen cambios de *MINDIN* ni de *PSCA* en hueso, es decir que no hubo presencia detectable de metástasis en el hueso, sí se observó un incremento de la expresión de la *integrina* $\beta 6$ en las tibias de los ratones tumorales frente al control, cambios que se podrían relacionar con modificaciones de la expresión génica de *TRAP* y de la microarquitectura ósea que se ha observado previamente (33), estos resultados sugieren que el cambio de expresión de integrinas se podría asociar a la formación de nichos premetastásicos óseos. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar que este incremento es dependiente de MINDIN.

Datos previos de nuestro grupo revelaron que MINDIN podría ser un factor clave que promueve el aumento de la adhesión de células de adenocarcinoma de próstata a superficies óseas (34). Además, se ha demostrado que MINDIN induce la activación de la vía de la quinasas ERK (34) en células de adenocarcinoma prostático. Para que se produzca un aumento en la adhesión suele ser necesario un incremento en la expresión de proteínas de unión a matriz, como las integrinas (62). También se ha documentado que la proteína MINDIN es capaz de interactuar con distintas integrinas en células del sistema inmune y tumorales (60,63). Por lo tanto, es posible que MINDIN se una a integrinas específicas en células de cáncer de próstata para mejorar su adhesión a la matriz extracelular ósea. A este respecto, se ha observado una relación entre las integrinas y las quinasas Fak y Src con la adhesión celular (64). Datos previos, muestran la acción supresora de los inhibidores de las quinasas Fak y Src sobre la capacidad de las células óseas para promover la adhesión de las células TRAMP-C1, lo que sugiere una interacción entre estas quinasas y las integrinas en la adhesión de las células de cáncer de próstata al hueso (33). Sin embargo, se desconoce qué integrinas podrían ser las implicadas en la interacción de las células tumorales con MINDIN para promover la adhesión celular (33). En este trabajo demostramos que la estimulación de las células tumorales prostáticas con MINDIN induce un incremento de la expresión de la *integrina* $\beta 6$, aumento que se ve revertido cuando se silencia *MINDIN* en las células tumorales, indicando una posible dependencia de la expresión de $\beta 6$ con *MINDIN*. Cabe destacar que diversos estudios han mostrado que la *integrina* $\alpha v \beta 6$ participa activamente en la activación de TGF- β (56,65), la remodelación de la matriz extracelular regulando la expresión de *MMP2* (56) y facilitando la adhesión al endotelio (66), lo que favorecería la colonización del entorno óseo. Sin embargo, nuestros datos no implican necesariamente que MINDIN se una a la *integrina* $\beta 6$ de manera directa.

La progresión a carcinoma invasivo y metastásico implica profundas alteraciones en la estructura y función epitelial, así como la alteración ósea para albergar el desarrollo metastásico. Las integrinas son mediadores esenciales de la tumorigénesis, la adhesión y la migración. En particular, se ha observado que la alta expresión de $\beta 6$ en carcinomas primarios de colon, los carcinomas de células escamosas, los tumores pancreáticos y de mama actúa como marcador pronóstico de enfermedad agresiva e incremento de la mortalidad de estos pacientes (67-70). Se ha observado que el patrón de expresión de la *integrina* $\beta 6$ es muy heterogénea en los tumores primarios de próstata; se encuentra aumentada su expresión en los casos de cáncer de próstata metastásico óseo, mientras que su expresión es indetectable en los casos de tumores de próstata neuroendocrino (55,56,71,72).

Por otro lado, la unión de MINDIN a las integrinas de osteoblastos y osteocitos podría desencadenar señales en estas células óseas para facilitar la adhesión de las células tumorales de próstata. Los efectos de MINDIN sobre el hueso no solo se restringen a la modificación de expresión de integrinas, sino que abarcan también acciones de esta proteína sobre la proliferación, diferenciación de los osteoblastos y estimulación de la vía de señalización β -catenina, así como la modulación de diferentes genes implicados en la formación y remodelación ósea (por ejemplo, *Runx2*, *osteocalcina*, *osterix*, *OPG*, *RANK-L*) (33). En el presente trabajo observamos que la estimulación con MINDIN indujo un incremento en la expresión de la *integrina* $\beta 6$ en osteoblastos y la *integrina* $\alpha 2$ en osteocitos, así como una disminución de $\alpha 2$ en osteoblastos, sugiriendo que dependiendo del tipo celular MINDIN podría modificar la expresión de diferentes integrinas. Aunque no se ha descrito ampliamente, la *integrina* $\alpha 2 \beta 1$ es un receptor principal de colágeno tipo I, componente predominante del hueso y se ha demostrado que células tumorales con alta expresión de $\alpha 2 \beta 1$ presentan mayor afinidad por tejido óseo, debido a su capacidad de adhesión al colágeno (73).

Sin embargo, en el modelo animal solo se observa modificaciones en la *integrina* $\beta 6$, a pesar de que las células mayoritarias en el hueso son los osteocitos. Estos cambios observados en ratones con tumores prostáticos inducidos por implantación directa de células TRAMP-C1 en el lóbulo prostático podrían deberse a que los osteoblastos son células más activas (particularmente en cuanto a producción de colágeno y formación ósea) y con una maquinaria celular diferente a los osteocitos lo que puede influir en que tengan una capacidad diferente para responder frente a proteínas que puedan transportarse en el suero, como es el caso de MINDIN y a que al haber usado un modelo premetastásico temprano (un mes de formación de tumor primario no metastásico) es probable que las concentraciones de MINDIN que hayan podido introducirse en el interior de la matriz, donde están los osteocitos, sean aún muy bajas para observar modificaciones en las integrinas expresadas por los osteocitos.

El conocimiento más detallado de los cambios moleculares que implican la formación del nicho premetastásico óseo, así como de los factores del secretoma que lo inducen, podría aportar nuevas dianas terapéuticas o protocolos de actuación, mejorando así su pronóstico. Los presentes datos muestran que la expresión de MINDIN en tumores primarios de próstata promueve cambios en la expresión de integrinas asociados a modificaciones del microambiente óseo y la expresión génica de las células tumorales de próstata. Nuestros datos podrían sugerir que MINDIN favorece la progresión tumoral y la creación de nichos premetastásicos en hueso mediante la sobreexpresión de la *integrina* $\beta 6$ en células tumorales y osteoblásticas. Sin embargo, se requieren más estudios (inmunohistoquímicos) para poder dilucidar los cambios que ocurren en los distintos tipos celulares, así como estudios para dilucidar como MINDIN podría influir en la sobreexpresión de la *integrina* $\beta 6$ y favorecer el desarrollo tumoral.

Aunque nuestro estudio ofrece nuevos conocimientos sobre el papel de MINDIN en la regulación de integrinas y la posible formación de nichos premetastásicos óseos en cáncer de próstata, presenta algunas limitaciones. En primer lugar, los modelos experimentales utilizados, tanto *in vitro* (líneas celulares osteoblásticas, osteocíticas y tumorales) como *in vivo* (modelo murino), pueden no reproducir completamente la complejidad del microambiente tumoral y óseo en humanos. Además, el modelo murino empleado no desarrolló metástasis óseas establecidas, lo que limita la evaluación directa de la progresión metastásica en condiciones clínicas reales. Otro aspecto para considerar es que el tamaño de muestra en los experimentos con animales fue limitado. Cabe destacar que los datos actuales apuntan a un efecto directo de MINDIN sobre la expresión de *integrina* $\beta 6$, si bien un estudio de correlación individualizado sería un enfoque valioso para investigaciones posteriores. Por último, aunque se evidenció la modulación diferencial de integrinas por MINDIN en distintos tipos celulares, se requieren estudios adicionales para confirmar los mecanismos moleculares involucrados y su relevancia en contextos humanos. Futuras investigaciones con modelos más representativos y mayor tamaño muestral serán necesarias para validar y ampliar estos resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- Mundy GR, Guise TA. Hormonal control of calcium homeostasis. Clin Chem 1999;45(8 Pt 2):1347-52.
- Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological bone remodeling: Systemic regulation and growth factor involvement. Physiology 2016;31(3):233-45. DOI: 10.1152/physiol.00061.2014
- Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, Kennedy O. Osteocytes: Master orchestrators of bone. Calcified Tissue International 2014;94(1):5-24. DOI: 10.1007/s00223-013-9790-y
- Guisse TA, Mohammad KS, Clines G, Stebbins EG, Wong DH, Higgins LS, et al. Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. Clin Cancer Res 2006;12(20 Pt 2):6213s-6216s. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1007
- Ell B, Kang Y. SnapShot: Bone metastasis. Cell 2012;151(3):690-690.e1. DOI: 10.1016/j.cell.2012.10.005
- Schafer EJ, Laversanne M, Sung H, Soerjomataram I, Briganti A, Dahut W, et al. Recent Patterns and Trends in Global Prostate Cancer Incidence and Mortality: An Update. Eur Urol 2025;87(3):302-313. DOI: 10.1016/j.eururo.2024.11.013
- Bagi C. M. Targeting of therapeutic agents to bone to treat metastatic cancer. Adv Drug Deliv Rev 2005;57(7):995-1010. DOI: 10.1016/j.addr.2004.12.014
- Guisse TA. Molecular mechanism of osteolytic bone metastases. Cancer 2000 Jun 15;88(12 Suppl):2892-8. DOI: 10.1002/1097-0142(20000615)88:12+<2892::aid-cncr>3.0.co;2-y
- Kingsley LA, Fournier PGJ, Chirgwin JM, Guise TA. Molecular biology of bone metastasis. Mol Cancer Ther 2007;6(10):2609-17. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0234
- Käkönen SM, Mundy GR. Mechanisms of osteolytic bone metastases in breast carcinoma. Cancer 2003;97(3 Suppl):834-9. DOI: 10.1002/cncr.11132
- Yoneda T. Cellular and molecular mechanisms of breast and prostate cancer metastasis to bone. Eur J Cancer 1998;34(2):240-5. DOI: 10.1016/s0959-8049(97)10132-0
- Urwin GH, Percival RC, Harris S, Beneton MN, Williams JL, Kanis JA. Generalised increase in bone resorption in carcinoma of the prostate. Br J Urol 1985;57(6):721-3. DOI: 10.1111/j.1464-410x.1985.tb07040.x
- Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, Thakur BK, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. Nat Cell Biol 2015;17(6):816-26. DOI: 10.1038/ncb3169.
- Kan C, Vargas G, Pape FL, Clézardin P. Cancer Cell Colonisation in the Bone Microenvironment. Int J Mol Sci 2016;17(10):1674. DOI: 10.3390/ijms17101674
- Lucarelli G, Rutigliano M, Bettocchi C, Palazzo S, Vavallo A, Galligante V, et al. Spondin-2, a secreted extracellular matrix protein, is a novel diagnostic biomarker for prostate cancer. J Urol 2013;190(6):2271-7. DOI: 10.1016/j.juro.2013.05.004
- Qian X, Li C, Pang B, Xue M, Wang J, Zhou J. Spondin-2 (SPON2), a more prostate-cancer-specific diagnostic biomarker. PLoS One 2012;7(5):e37225. DOI: 10.1371/journal.pone.0037225
- Zhu BP, Guo ZQ, Lin L, Liu Q. Serum BSP, PSA, and Spondin-2 levels in prostate cancer and the diagnostic significance of their ROC curves in bone metastasis. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2017;21(1):61-7.
- Manda R, Kohno T, Matsuno Y, Takenoshita S, Kuwano H, Yokota J. Identification of genes (SPON2 and C20orf2) differentially expressed between cancerous and noncancerous lung cells by mRNA differential display. Genomics 1999;61(1):5-14. DOI: 10.1006/geno.1999.5939
- Liao CH, Yeh SC, Huang YH, Chen RN, Tsai MM, Chen WJ, et al. Positive regulation of spondin 2 by thyroid hormone is associated with cell migration and invasion. Endocr Relat Cancer 2010;17(1):99-111. DOI: 10.1677/ERC-09-0050
- Luo JH, Ren B, Keryanov S, Tseng GC, Rao UN, Monga SP, et al. Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular

- carcinomas and hepatoblastomas. *Hepatology* 2006;44(4):1012-24. DOI: 10.1002/hep.21328
21. Guleng B, Lian YM, Ren JL. Mindin is upregulated during colitis and may activate NF-kappaB in a TLR-9 mediated manner. *World J Gastroenterol* 2010;16(9):1070-5. DOI: 10.3748/wjg.v16.i9.1070
 22. Rajkumar T, Vijayalakshmi N, Gopal G, Sabitha K, Shirley S, Raja UM, et al. Identification and validation of genes involved in gastric tumorigenesis. *Cancer Cell Int* 2010;10:45. DOI: 10.1186/1475-2867-10-45
 23. Ma HM, Yu M, Wu C, Huang HB, Li YW, Zhang P, et al. Overexpression of Spondin-2 Is Associated with Recurrence-Free Survival in Patients with Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Dis Markers* 2020;2020:5074239. DOI: 10.1155/2020/5074239
 24. Simon I, Liu Y, Krall KL, Urban N, Wolfert RL, Kim NW, et al. Evaluation of the novel serum markers B7-H4, Spondin 2, and DcR3 for diagnosis and early detection of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2007;106(1):112-8. DOI: 10.1016/j.ygygno.2007.03.007
 25. Ellsworth RE, Seebach J, Field LA, Heckman C, Kane J, Hooke JA, et al. A gene expression signature that defines breast cancer metastases. *Clin Exp Metastasis* 2009;26(3):205-13. DOI: 10.1007/s10585-008-9232-9
 26. Badea L, Herlea V, Dima SO, Dumitrascu T, Popescu I. Combined gene expression analysis of whole-tissue and microdissected pancreatic ductal adenocarcinoma identifies genes specifically overexpressed in tumor epithelia. *Hepatogastroenterology* 2008;55(88):2016-27.
 27. Razvi MH, Peng D, Dar AA, Powell SM, Frierson HF Jr, Moskaluk CA, et al. Transcriptional oncogenomic hot spots in Barrett's adenocarcinomas: serial analysis of gene expression. *Genes Chromosomes Cancer* 2007;46(10):914-28. DOI: 10.1002/gcc.20479
 28. Qian X, Li C, Pang B, Xue M, Wang J, Zhou J. Spondin-2 (SPON2), a more prostate-cancer-specific diagnostic biomarker. *PLoS One* 2012;7(5):e37225. DOI: 10.1371/journal.pone.0037225
 29. Anderson GL, McIntosh M, Wu L, Barnett M, Goodman G, Thorpe JD, et al. Assessing lead time of selected ovarian cancer biomarkers: a nested case-control study. *J Natl Cancer Inst* 2010;102(1):26-38. DOI: 10.1093/jnci/djp438
 30. Barbieri CE. Evolution of novel biomarkers for detection of prostate cancer. *J Urol* 2013;190(6):1970-1. DOI: 10.1016/j.juro.2013.09.018
 31. Lucarelli G, Rutigliano M, Bettocchi C, Palazzo S, Vavallo A, Galleffiante V, et al. Spondin-2, a secreted extracellular matrix protein, is a novel diagnostic biomarker for prostate cancer. *J Urol* 2013;190(6):2271-7. DOI: 10.1016/j.juro.2013.05.004
 32. Oikonomopoulou K, Li L, Zheng Y, Simon I, Wolfert RL, Valik D, et al. Prediction of ovarian cancer prognosis and response to chemotherapy by a serum-based multiparametric biomarker panel. *Br J Cancer* 2008;99(7):1103-13. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604630
 33. Ardura JA, Álvarez-Carrión L, Gutiérrez-Rojas I, Friedman PA, Gortázar AR, Alonso V. MINDIN secretion by prostate tumors induces premetastatic changes in bone via β -catenin. *Endocr Relat Cancer* 2020;27(7):441-56. DOI: 10.1530/ERC-20-0116
 34. Ardura JA, Gutiérrez-Rojas I, Álvarez-Carrión L, Rodríguez-Ramos MR, Pozuelo JM, Alonso V. The secreted matrix protein mindin increases prostate tumor progression and tumor-bone cross-talk via ERK 1/2 regulation. *Carcinogenesis* 2019;40(7):828-39. DOI: 10.1093/carcin/bgz105
 35. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110(6):673-87. DOI: 10.1016/s0092-8674(02)00971-6
 36. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999;285. DOI: 10.1126/science.285.5430.1028
 37. Berrier AL, Yamada KM. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* 2007;213(3):565-73. DOI: 10.1002/jcp.21237
 38. Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:463-518. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.463
 39. Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fässler R. Integrins in invasive growth. *J Clin Invest* 2002;109(8):999-1006. DOI: 10.1172/JCI15468
 40. Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5(10):816-26. DOI: 10.1038/nrm1490
 41. Fornaro M, Manes T, Languino LR. Integrins and prostate cancer metastases. *Cancer Metastasis Rev* 2001;20(3-4):321-31. DOI: 10.1023/a:1015547830323
 42. Edlund M, Sung SY, Chung LW. Modulation of prostate cancer growth in bone microenvironments. *J Cell Biochem* 2004;91(4):686-705. DOI: 10.1002/jcb.10702
 43. Knudsen BS, Miranti CK. The impact of cell adhesion changes on proliferation and survival during prostate cancer development and progression. *J Cell Biochem* 2006;99(2):345-61. DOI: 10.1002/jcb.20934
 44. Goel HL, Li J, Kogan S, Languino LR. Integrins in prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer* 2008;15(3):657-64. DOI: 10.1677/ERC-08-0019
 45. He YW, Li H, Zhang J, Hsu CL, Lin E, Zhang N, et al. The extracellular matrix protein mindin is a pattern-recognition molecule for microbial pathogens. *Nat Immunol* 2004;5(1):88-97. DOI: 10.1038/ni1021
 46. Jia W, Li H, He YW. The extracellular matrix protein mindin serves as an integrin ligand and is critical for inflammatory cell recruitment. *Blood* 2005;106(12):3854-9. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1658
 47. Nagle RB, Knox JD, Wolf C, Bowden GT, Cress AE. Adhesion molecules, extracellular matrix, and proteases in prostate carcinoma. *J Cell Biochem Suppl* 1994;19:232-7.
 48. Bonkhoff H, Stein U, Remberger K. Differential expression of alpha 6 and alpha 2 very late antigen integrins in the normal, hyperplastic, and neoplastic prostate: simultaneous demonstration of cell surface receptors and their extracellular ligands. *Hum Pathol* 1993;24(3):243-8. DOI: 10.1016/0046-8177(93)90033-d
 49. Huang YL, Liang CY, Ritz D, Coelho R, Septiadi D, Estermann M, et al. Collagen-rich omentum is a premetastatic niche for integrin α 2-mediated peritoneal metastasis. *Elife*. 2020;9:e59442. DOI: 10.7554/eLife.59442
 50. Gaballa R, Ali HEA, Mahmoud MO, Rhim JS, Ali HI, Salem HF, et al. Exosomes-Mediated Transfer of Itga2 Promotes Migration and Invasion of Prostate Cancer Cells by Inducing Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cancers (Basel)* 2020;12(8):2300. DOI: 10.3390/cancers12082300
 51. Nagle RB, Hao J, Knox JD, Dalkin BL, Clark V, Cress AE. Expression of hemidesmosomal and extracellular matrix proteins by normal and malignant human prostate tissue. *Am J Pathol* 1995;146(6):1498-507.
 52. Knox JD, Cress AE, Clark V, Manriquez L, Affinito KS, Dalkin BL, et al. Differential expression of extracellular matrix molecules

- and the alpha 6-integrins in the normal and neoplastic prostate. *Am J Pathol* 1994;145(1):167-74.
53. Zheng DQ, Woodard AS, Fornaro M, Tallini G, Languino LR. Prostatic carcinoma cell migration via alpha(v)beta3 integrin is modulated by a focal adhesion kinase pathway. *Cancer Res* 1999;59(7):1655-64.
 54. Schneider JG, Amend SR, Weilbaecher KN. Integrins and bone metastasis: integrating tumor cell and stromal cell interactions. *Bone* 2011;48(1):54-65. DOI: 10.1016/j.bone.2010.09.016
 55. Lu H, Wang T, Li J, Fedele C, Liu Q, Zhang J, et al. $\alpha v \beta 6$ Integrin Promotes Castrate-Resistant Prostate Cancer through JNK1-Mediated Activation of Androgen Receptor. *Cancer Res* 2016;76(17):5163-74. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0543
 56. Dutta A, Li J, Lu H, Akech J, Prapat J, Wang T, et al. Integrin $\alpha v \beta 6$ promotes an osteolytic program in cancer cells by upregulating MMP2. *Cancer Res* 2014;74(5):1598-608. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1796
 57. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3(6):1101-8. DOI: 10.1038/nprot.2008.73
 58. Li H, Oliver T, Jia W, He YW. Efficient dendritic cell priming of T lymphocytes depends on the extracellular matrix protein mindin. *EMBO J* 2006;25(17):4097-107. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601289
 59. Liu Y, Cao X. Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell* 2016;30(5):668-81. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.09.011
 60. Lu H, Feng Y, Hu Y, Guo Y, Liu Y, Mao Q, et al. Spondin 2 promotes the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells. *J Cell Mol Med* 2020;24(1):98-113. DOI: 10.1111/jcmm.14618
 61. Simon I, Liu Y, Krall KL, Urban N, Wolfert RL, Kim NW, et al. Evaluation of the novel serum markers B7-H4, Spondin 2, and DcR3 for diagnosis and early detection of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2007;106(1):112-8. DOI: 10.1016/j.ygyno.2007.03.007
 62. Moreno-Layseca P, Icha J, Hamidi H, Ivaska J. Integrin trafficking in cells and tissues. *Nat Cell Biol* 2019;21(2):122-32. DOI: 10.1038/s41556-018-0223-z
 63. Zhang YL, Li Q, Yang XM, Fang F, Li J, Wang YH, et al. SPON2 Promotes M1-like Macrophage Recruitment and Inhibits Hepatocellular Carcinoma Metastasis by Distinct Integrin-Rho GTPase-Hippo Pathways. *Cancer Res* 2018;78(9):2305-17. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2867
 64. Huveneers S, Danen EH. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* 2009;122(Pt 8):1059-69. DOI: 10.1242/jcs.039446
 65. Dutta A, Li J, Fedele C, Sayeed A, Singh A, Violette SM, et al. $\alpha v \beta 6$ integrin is required for TGF β 1-mediated matrix metalloproteinase2 expression. *Biochem J* 2015;466(3):525-36. DOI: 10.1042/BJ20140698
 66. Passen CV, Krug J, Weiß L, Abdou MM, Tripal P, Schmid B, et al. Integrin $\beta 6$ expression in colorectal cancer cells promotes liver metastasis through enhanced adhesion to endothelial fibronectin. *Int J Cancer* 2025;157(7):1481-95. DOI: 10.1002/ijc.35504
 67. Sheppard D. Integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24(3):395-402. DOI: 10.1007/s10555-005-5131-6
 68. Danen EH, Yamada KM. Fibronectin, integrins, and growth control. *J Cell Physiol* 2001;189(1):1-13. DOI: 10.1002/jcp.1137
 69. Bates RC, Bellovin DI, Brown C, Maynard E, Wu B, Kawakatsu H, et al. Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *J Clin Invest* 2005;115(2):339-47. DOI: 10.1172/JCI23183
 70. Arihiro K, Kaneko M, Fujii S, Inai K, Yokosaki Y. Significance of alpha 9 beta 1 and alpha v beta 6 integrin expression in breast carcinoma. *Breast Cancer* 2000;7(1):19-26. DOI: 10.1007/BF02967183
 71. Krishn SR, Garcia V, Naranjo NM, Quaglia F, Shields CD, Harris MA, et al. Small extracellular vesicle-mediated ITGB6 siRNA delivery downregulates the $\alpha v \beta 6$ integrin and inhibits adhesion and migration of recipient prostate cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2022;23(1):173-85. DOI: 10.1080/15384047.2022.2030622
 72. Quaglia, F. et al. Differential expression of $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 6$ integrins in prostate cancer progression. *PLoS One* 2021;16.
 73. Bendas G, Borsig L. Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *Int J Cell Biol* 2012;2012:676731. DOI: 10.1155/2012/676731