

# RET podría actuar como un gen supresor de tumores en células de cáncer de cuello uterino

Mariana A. Martínez-Castillo,<sup>1,2</sup>  María A. Hernández-Cueto,<sup>3</sup>  Keiko Taniguchi-Ponciano<sup>4</sup>   
y Mauricio Salcedo<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Unidad de Investigación en Biomedicina y Oncología Genómica, Hospital de Gineco Pediatría 3A, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS); <sup>2</sup>Programa en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado, Circuito de Posgrados, Universidad Nacional Autónoma de México; <sup>3</sup>Laboratorio Central de Epidemiología, Centro Médico Nacional La Raza, IMSS; <sup>4</sup>Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Ciudad de México, México

## Resumen

**Antecedentes:** El gen *RET* es considerado oncogén para el cáncer de tiroides, pero gen supresor en el cáncer de colon. **Objetivo:** Conocer el papel del gen *RET* en el cáncer cervicouterino (CC). **Material y métodos:** Se evaluaron mediante inmunohistoquímica microarrays de tejido sano, de lesiones intraepiteliales escamosas de bajo y alto grado, y de tejidos de CC. Se evaluó la tinción nuclear y de membrana de las células con el sistema Olympus cellSens. Se estudió DNA de células cervicales y de líneas celulares en búsqueda de mutaciones puntuales del gen *RET* y el estado de metilación de su promotor. Para los análisis de los datos se utilizó el programa GraphPad Prism versión 9.3.1. **Resultados:** Las células epiteliales de cuello uterino sano expresan la proteína *RET*, mientras que la expresión de *RET* disminuye y es similar en las lesiones precursoras (75-90% de bajo o alto grado), y se observa falta de expresión en las muestras de CC (escamoso o adenocarcinoma). La expresión en las lesiones intraepiteliales cervicales glandulares no presenta diferencias de sus controles glandulares. Las células de CC no presentaron mutaciones puntuales en los puntos calientes de los exones 10 y 16, pero la región promotora se encontró metilada. **Conclusiones:** La pérdida de la expresión del gen *RET* se correlaciona con la metilación de su promotor en las células transformadas del cuello uterino. Estos hallazgos sugieren que el gen *RET* actuaría como gen supresor de tumor en el CC.

**PALABRAS CLAVE:** *RET*. Cáncer cervicouterino. Gen supresor de tumor. Expresión. Mutación.

## *RET could act as suppressor tumor gene in cervical cancer cells*

## Abstract

**Background:** *RET* gene is an oncogene for thyroid cancer, in contrast as tumor suppressor gene in colon cancer. **Objective:** To know the role of *RET* gene in cervical cancer (CC) cells. **Materials and methods:** Tissue microarray harboring healthy, low- or high-squamous intraepithelial lesions (LSIL or HSIL), and CC tissues were evaluated by immunohistochemistry. Nuclear cellular membranes were evaluated by an Olympus cellSens Dimension system. DNA from cervical cells and cervical-cell lines were assessed for detecting *RET* point mutation and methylation promoter status. GraphPad Prism ver. 9.3.1 software was used for the analysis. **Results:** Healthy cervical samples expressed *RET* protein, in contrast a quite similar proportion 75-90% of the LSIL or HSIL, or CC samples (squamous or adenocarcinoma) demonstrated a lack of *RET* expression. Cervical glandular intraepithelial lesions presented a similar expression pattern compared with the control group. The CC cells do not exhibit *RET* point mutation for exons 10 and 16, but the *RET* gene promoter was methylated. **Conclusions:** The lack of *RET* expression could correlate with the promoter methylated in the transformed cervical epithelial cells. These findings could suggest that *RET* gene acts as tumor suppressor gene in CC.

**KEYWORDS:** *RET*. Cervical cancer. Tumor suppressor gene. Expression. Mutation.

### \*Correspondencia:

Mauricio Salcedo  
E-mail: masava89@gmail.com

Fecha de recepción: 09-11-2024

Fecha de aceptación: 11-02-2025

DOI: 10.24875/GMM.M25000964

Gac Med Mex. 2025;161:138-145

Disponible en PubMed

www.gacetamedicademexico.com

0016-3813/© 2025 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introducción

El cáncer cervicouterino (CC) sigue siendo un problema de salud pública, principalmente en países en vías de desarrollo como México.<sup>1</sup> La infección persistente por el virus del papiloma humano (VPH) es el principal factor de riesgo para el desarrollo de CC;<sup>2</sup> sin embargo, la infección por VPH es necesaria, pero no suficiente, para provocar una transformación maligna, pues esta implica otros cambios moleculares en genes celulares, oncogenes y genes supresores de tumores.<sup>3,4</sup> Un abordaje para determinar cambios en el ADN del genoma tumoral es el análisis de hibridación genómica comparativa (CGH, *comparative genomic hybridization*), ampliamente explorado en el CC.<sup>5-10</sup> Evidentemente, herramientas moleculares cada vez más avanzadas revelan nuevos hallazgos moleculares. En este contexto, nuestro grupo, utilizando chips de CGH de alta resolución AFFY, observó cambios en la región cromosómica 10q11.2 (gen RET) (datos no mostrados, comunicación personal). Hasta donde sabemos, esta región citogenética no se ha descrito nunca en el CC. En los últimos años, cada vez más tipos tumorales han expresado niveles notablemente altos de proteína RET de tipo salvaje en algunos casos,<sup>11-14</sup> lo cual podría tener implicaciones en el avance y la proliferación tumoral.

El receptor tirosina cinasa transmembrana RET es necesario para el desarrollo, la maduración y el mantenimiento normales de varios tejidos a través de las vías de señalización celular que regula. Las señales mediadas por RET están implicadas en procesos biológicos tales como la proliferación, la migración, la invasión y la supervivencia celulares. No sorprende que la alteración de estos mecanismos contribuya al desarrollo de algunos tipos de cáncer.<sup>15</sup> RET es un gen asociado a cáncer implicado en tumores hereditarios y esporádicos, bien sea por mutaciones de ganancia de función que conducen a una activación constitutiva o por expresión aberrante, principalmente en el cáncer de tiroides y el cáncer de pulmón, entre otros.<sup>16</sup> Hasta donde sabemos, la expresión de RET en células de CC no se ha estudiado, razón por la cual optamos por buscar posibles cambios en tejidos y líneas celulares de CC.

## Material y métodos

### Recogida de muestras biológicas

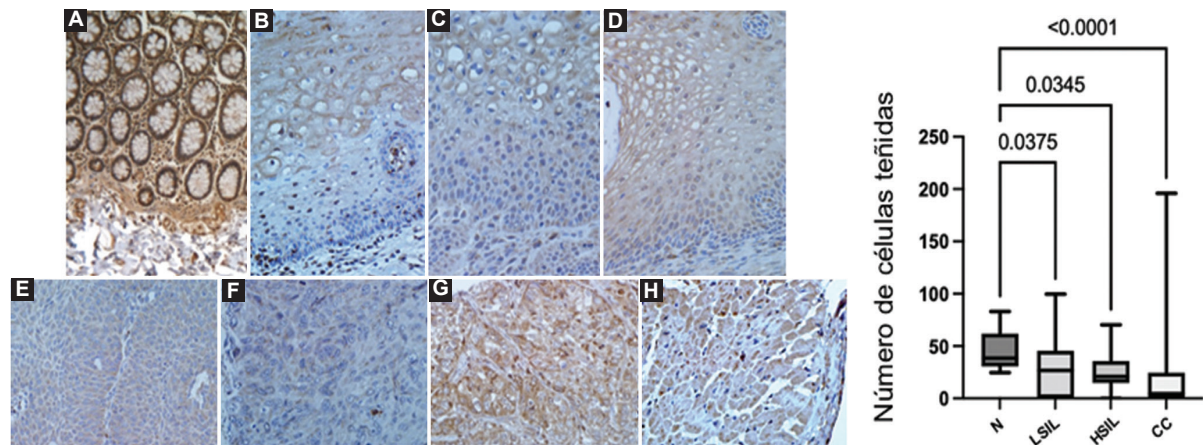
Se recopilaron 156 muestras cervicales de pacientes atendidas en el servicio de colposcopia del

Hospital General de México de la Secretaría de Salud. El estudio recibió la aprobación ética de los comités de revisión institucionales correspondientes, y todas las muestras fueron recopiladas después de que las pacientes dieran su consentimiento informado por escrito. Este proyecto fue aprobado con el número de registro CNIC-IMSS, -R2014-3602-5.

Se analizaron muestras de 20 tejidos escamosos normales, 10 tejidos glandulares normales, 50 lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL, *low-grade squamous intraepithelial lesion*), 30 lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL, *high-grade squamous intraepithelial lesion*), 16 neoplasias intraepiteliales glandulares cervicales y 30 carcinomas cervicales, incluidos adenocarcinomas y carcinomas de células escamosas. Los tejidos fueron obtenidos previo a la administración de cualquier tratamiento. Los tejidos normales se obtuvieron de histerectomías sin lesión cervical. Además, se obtuvo información clinicopatológica de los registros de los pacientes. El presente estudio se realizó siguiendo la Declaración STROBE.

### Desarrollo del microarray tisular y prueba de inmunodetección

Se realizaron cortes de tejidos de muestras cervicales incluidas en parafina que se tiñeron con hematoxilina y eosina. Un patólogo revisó todas las muestras y seleccionó el área representativa. Se construyó un bloque de *microarray* tisular que incluyó 156 casos por triplicado. Se tomaron secciones representativas de 0.6 mm de bloques de tejido fijados en formol e incluidos en parafina utilizando agujas de punta roma y se colocaron en el bloque de *microarray* para proporcionar un área de análisis más amplia utilizando un *microarray* tisular (Chemicon Co., MA, Estados Unidos de América). Se cortaron secciones de 4 µm y se colocaron en portaobjetos recubiertos. La inmunotinción se realizó empleando el sistema EnVision FLEX (DAKO, Hamburgo, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. Tras la desparafinación y deshidratación, las secciones tisulares se colocaron en solución de recuperación de antígenos EnVision FLEX precalentada a 125 °C durante 5 minutos para la recuperación de epítomos inducida por calor. Después, cada sección se expuso a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 10 minutos para bloquear la peroxidasa endógena.



**Figura 1.** Inmunodetección de RET en tejidos escamosos cervicales. **A:** colon sano. **B:** epitelio cervical sano. **C:** pérdida en LSIL. **D:** HSIL. **E:** membranas de carcinoma in situ. **F:** ausencia total en epitelio canceroso. **G:** carcinoma de células escamosas positivo. **H:** músculo cardíaco. **A y H:** muestras utilizadas como controles positivo y negativo, respectivamente. Los cortes tisulares muestran una inmunoprecipitación de color marrón; todos los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina, amplificación original  $\times 40$ . Análisis del recuento de células positivas. Diferencias significativas entre tejidos epiteliales sanos, lesiones precursoras cervicales, LSIL, HSIL y CC escamoso. No hubo diferencias estadísticas entre tejido sano, neoplasia intraepitelial glandular cervical y adenocarcinoma. El análisis se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis. CC: cáncer cervicouterino; HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesion; LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesion; N: normal sano.

La incubación con anticuerpos monoclonales anti-RET (8D10C9 Abcam) diluidos a 1:100 se realizó durante la noche en una cámara húmeda a 4 °C. Tras lavado con solución salina tamponada con fosfato (PBS 0.01 M, pH 7.4) se utilizó el enlazador de ratón EnVision FLEX para amplificar la señal de los anticuerpos primarios. Las secciones se incubaron con un conjugado de peroxidasa de rábano picante como anticuerpos secundarios (EnVision FLEX HRP) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Tras el lavado con PBS, las muestras se tiñeron con diaminobencidina recién preparada (EnVision FLEX DAB+ Cromógeno) con  $H_2O_2$  al 0.03% durante 10 minutos y fueron contrateñidas con hematoxilina, seguido de deshidratación y montaje. Todos los portaobjetos fueron evaluados por el patólogo. Se empleó colon normal como control positivo y tejido cardíaco como control negativo. La tinción positiva se evaluó basándose en la señal de membrana utilizando el *software* del sistema Olympus cellSens Dimension, teniendo en cuenta el número de células, el área de fracción y los píxeles por área en cada punto.

### Extracción y aislamiento del ADN

La homogeneización de tejidos se realizó en un Tissue Lyser (QIAGEN, Alemania) con reactivo TRIzol (Thermo Fisher). La extracción de ADN se realizó según el kit RNAeasy (QIAGEN, Alemania)

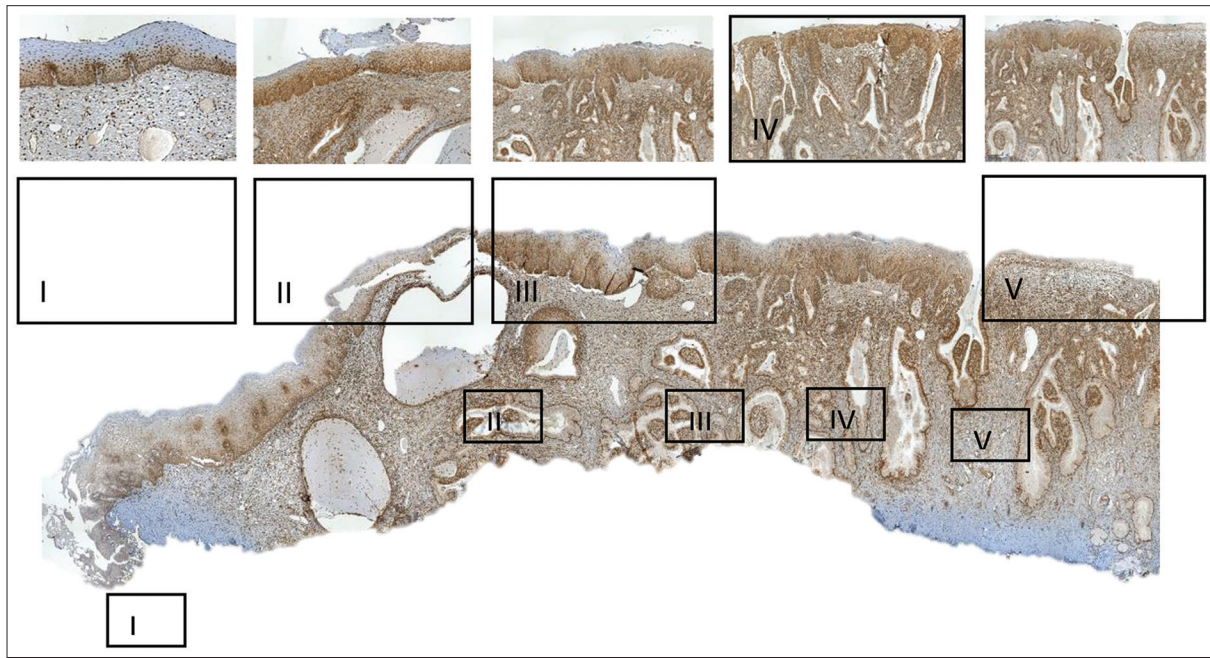
siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadió etanol absoluto a la fase orgánica obtenida en la extracción de ARN y se centrifugó durante 5 minutos a 8000  $\times$  g. El *pellet* se lavó durante 10 minutos en un agitador con *buffer* de citrato seguido de centrifugación. Se añadió etanol al 75% y se centrifugó durante 5 minutos a 8000  $\times$  g. El sobrenadante fue descartado, se añadió *buffer* de lisis nuclear y proteinasa K (1 mg/ml), y se incubó a 56 °C durante la noche.

Se añadió acetato de amonio (5 M) y se centrifugó durante 30 minutos a 8000  $\times$  g. Los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo, se añadió isopropanol y se incubó durante la noche a -20 °C. El *pellet* fue lavado con etanol al 70% y se centrifugó a 8000  $\times$  g durante 5 minutos. Los *pellets* de ADN fueron nuevamente suspendidos en agua libre de nucleasas y se cuantificó el ADN utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos de América).

### Análisis de mutaciones de RET en células cervicales

Para determinar la presencia de mutaciones en el gen RET se realizaron las condiciones de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polimerase chain reaction*) para los exones 10 y 16 del gen RET, según Sharma y Saranath.<sup>17</sup> Después de la





**Figura 2.** Expresión de RET durante la progresión del cáncer cervical. Tinción inmunohistoquímica para RET en una muestra cervical que representa el avance completo de la enfermedad. Las ampliaciones mayores (I-V) muestran que la expresión de RET está presente en el epitelio sano normal, mientras que su expresión disminuye a medida que progresa hacia lesiones precursoras y cáncer.

amplificación por PCR, la reacción se purificó con el kit Wizard® SV Gel PCR Clean-Up System siguiendo las especificaciones del fabricante (Promega, Estados Unidos de América). La secuenciación cíclica se realizó con el analizador genético ABI Prism® 3130 (Applied Biosystem, Estados Unidos de América) utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Estados Unidos de América) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las muestras se secuenciaron exitosamente por Sanger con buena cobertura en ambos exones.

### **Prueba de PCR específica de metilación (MSP)**

El ADN se trató con bisulfito de sodio utilizando el kit EZ DNA Methylation (Zymo Research, Estados Unidos de América) siguiendo las especificaciones del fabricante. La reacción de PCR en un volumen final comprendió 12.5 µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Estados Unidos de América), 1 µl de cada uno de los cebadores directo e inverso (0.2 µM de concentración final), 10 µl de agua libre de ARNasa y 1 µl de ADN tratado con bisulfito (100 ng). La prueba de PCR específica de metilación (MSP, *methyl specific PCR*) se realizó tal como se ha descrito anteriormente.<sup>18</sup> Todas las muestras se sometieron como mínimo a dos rondas

independientes de tratamiento con bisulfito de sodio y pruebas MSP. Los productos de MSP se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio, y después se visualizaron en un transiluminador UV (UltraViolet). Se utilizó el kit de control de ADN metilado y no metilado Cells-to-CpG (Applied Biosystems, Estados Unidos de América) como control positivo y negativo, respectivamente.

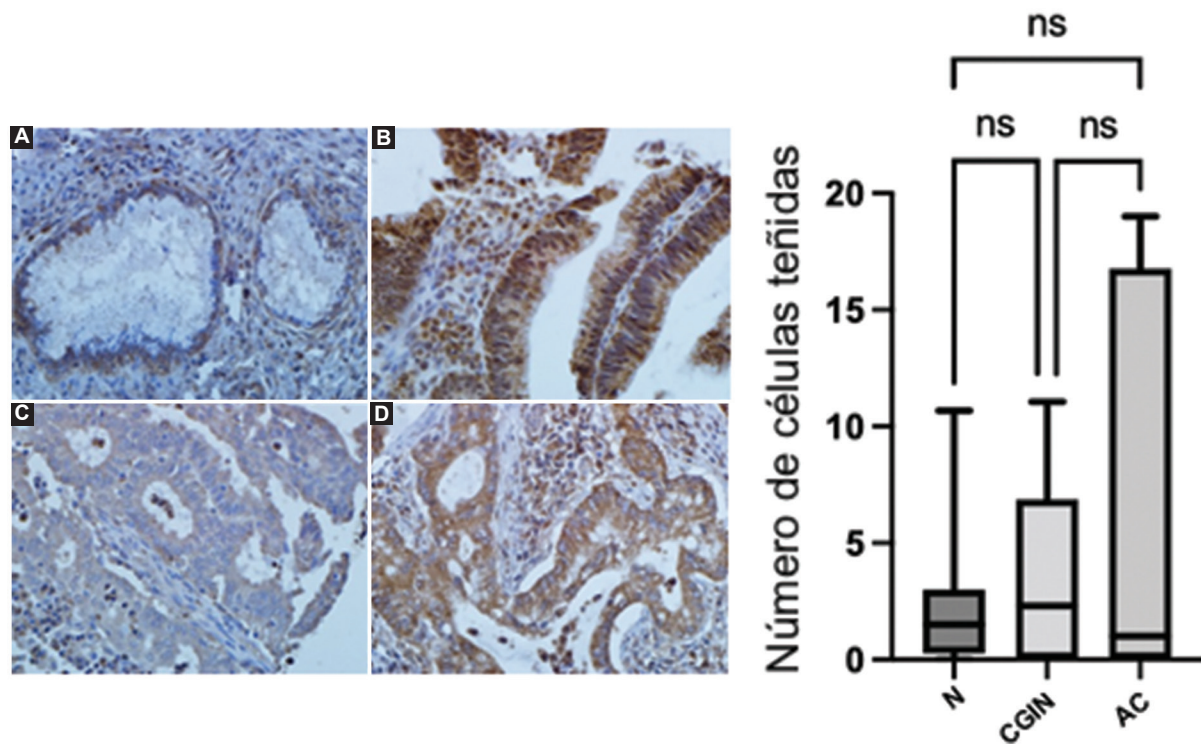
### **Análisis estadístico**

Para el análisis de los datos se empleó el software estadístico GraphPad Prism ver. 9.3.1. Se realizaron pruebas de ANOVA unidireccional y Kruskal-Wallis para comparar grupos, con un nivel de significación estadística del 95% ( $p < 0.05$ ).

## **Resultados**

### **Inmunodetección de RET en el epitelio cervical**

Para interpretar los hallazgos de la inmunodetección del gen RET, los cortes de *microarray* tisular fueron sometidos a una prueba de



**Figura 3.** Expresión de RET en tejidos glandulares cervicales. **A:** epitelio endocervical sano. **B:** neoplasia intraepitelial glandular cervical (CGIN). **C:** epitelio glandular negativo de un adenocarcinoma (AC). **D:** epitelio glandular positivo de un AC. Los cortes tisulares muestran una inmunoprecipitación de color marrón; todos los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina, ampliación original  $\times 40$ . N: normal sano.

inmunohistoquímica. Además, se procedió a analizar la inmunorreacción en la membrana celular en todos los tejidos.

Curiosamente, todas las muestras cervicales normales mostraron inmunotinción positiva en las capas superiores e intermedias del epitelio con tinción moderada, donde las células epiteliales se dividen constantemente. Se observó una falta de expresión en las capas celulares superficiales y basales (Figura 1).

### Inmunodetección de RET en muestras de tejido con lesiones cervicales

Se observaron cambios significativos en la expresión del gen RET en las lesiones cervicales. En la mayoría de los tejidos de LSIL (el 88% de los casos;  $p = 0.0375$ ) se observó una falta de expresión del gen RET y solo el 12% de los casos mantuvieron la expresión. Una proporción bastante similar de tejidos de HSIL mostraron el patrón anteriormente observado (el 90% de los casos;  $p = 0.0345$ ).

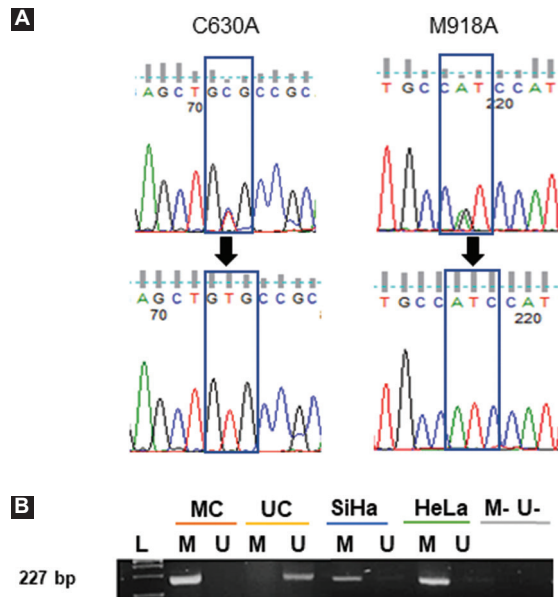
Además, las muestras de CC revelaron una expresión marcadamente baja de RET solo en el 24% de los

casos ( $p < 0.0001$ ), observándose también una menor intensidad de la tinción ( $p < 0.0001$ ); no obstante, comparado con las muestras sanas, se encontró una mayor intensidad y un mayor número de células positivas. En términos de intensidad de la señal inmunológica, se asignó una tinción moderada a las muestras sanas y una señal fuerte para las muestras de CC. En el 30% de las células en cada tejido de CC se observó expresión de RET en la membrana. Se podría decir que la regulación positiva de RET parece desempeñar un papel en el avance del cáncer (Figuras 1-2).

### Expresión de RET en el epitelio endocervical

La neoplasia intraepitelial glandular cervical tiene un patrón de expresión similar comparado con el grupo de control. En este sentido, no se hallaron diferencias significativas entre estos grupos ( $p = 0.999$ ) (Figura 3).

En los adenocarcinomas, solo unas pocas muestras expresaron RET en la membrana celular (30%), y la inmunorreacción se observó en un pequeño número de células (en torno a 10-18 membranas de 100).



**Figura 4.** Evaluación de dos eventos moleculares del gen RET en células de cáncer cervicouterino (CC). **A:** electroferograma parcial representativo del gen RET (puntos calientes 630 y 918 de los exones 10 y 16) que muestra la secuencia de tipo salvaje en células de CC (se evaluaron las líneas celulares SiHa, HeLa, Caski y C33A). Las secuencias se compararon con mutaciones puntuales positivas encontradas en sujetos NEM2 o NEM3, respectivamente; la flecha negra indica la sustitución de nucleótidos. **B:** resultados finales de la prueba MSP RET de células cervicales representativas SiHa y HeLa. La banda de 227 pares de bases indica la región CpG analizada del promotor del gen RET. L: escalera de peso molecular de ADN; M: metilado; M-: control negativo de metilación; MC: control metilado; U: no metilado; U-: control negativo de no metilación; UC: control no metilado.

Aunque la intensidad de la tinción fue mayor que en el grupo de control, este hallazgo no es estadísticamente significativo ( $p = 0.999$ ). En otras palabras, se observa expresión de RET en el 25% de los carcinomas de células escamosas y los adenocarcinomas, siendo la fuerte inmunorreacción en la membrana citoplasmática o celular más evidente que en las muestras sanas.

Con respecto a la inmunotinción positiva en tejidos normales, el epitelio endocervical llamó nuestra atención. RET se expresa en las células endocervicales tal como ocurre en las células exocervicales, mientras que las lesiones intraepiteliales glandulares cervicales mostraron un patrón de expresión similar al de las muestras de endocérnix sanas ( $p = 0.999$ ).

### **Análisis mutacional de RET en líneas celulares y muestras de tejido de CC**

Es bien conocido que uno de los principales mecanismos moleculares de la activación

oncogénica del gen RET son las mutaciones puntuales de ganancia de función. Se evaluó el ADN de células cervicales para las mutaciones patógenas más frecuentes de RET (puntos calientes en los exones 10 y 16). Todo el ADN analizado de líneas celulares y muestras de CC no reveló mutaciones puntuales en el gen RET (Figura 4A).

### **Estado de metilación del promotor de RET en líneas celulares de CC**

Para explorar otro mecanismo molecular implicado en la expresión de RET procedimos a analizar una región del promotor del gen RET previamente descrita como metilada,<sup>17</sup> y luego se examinaron las líneas celulares de CC SiHa y HeLa. Ambas líneas celulares exhibieron metilación de la región del promotor de RET evaluada, lo cual podría corresponder a la falta de expresión observada en la mayoría de las biopsias de CC (Figura 4B).

### **Discusión**

En el presente trabajo se observó una menor expresión de RET tanto en tejido precursor (lesiones de alto riesgo) como en tejido invasivo del cuello uterino, sin evidencia de mutaciones puntuales en el gen RET.

El CC sigue siendo un grave problema de salud pública en todo el mundo, principalmente en los países de bajo poder adquisitivo, incluido México, donde la mayoría de los casos se detectan en fase avanzada.<sup>19</sup> A pesar de la implementación de campañas de vacunación y detección molecular del VPH, los datos de prevalencia y de mortalidad siguen siendo altos, lo cual sugiere la presencia de diversas barreras políticas, sociales y económicas.<sup>20</sup>

Por otro lado, el RET es un receptor transmembrana tirosina cinasa esencial para el desarrollo, la maduración y el mantenimiento normales de varios tejidos a través de vías de señalización celular bien reguladas. Las señales mediadas por RET están implicadas en los procesos biológicos de proliferación, migración, invasión y supervivencia celulares, por lo que no debería sorprender que los cambios en estos mecanismos contribuyan al desarrollo de diversos tipos de cáncer.<sup>14</sup> En este sentido, alteraciones moleculares tales como mutaciones de ganancia de función, que conducen a una activación constitutiva o a una expresión aberrante de RET, están implicadas principalmente en cánceres de tiroides, MEN2 y MEN3, y cáncer pulmonar de células no pequeñas,<sup>15</sup>



en tumores tanto hereditarios como esporádicos. Además, cada vez hay más evidencia de que diferentes tipos de tumores se asocian a mutaciones específicas en RET.<sup>11-13</sup>

Son muchos los informes de CGH publicados sobre muestras de CC.<sup>5-10</sup> Recientemente, nuestro equipo de trabajo realizó un análisis de CGH mediante AFFYchip en muestras de CC, incluido el adenocarcinoma. Aunque nuestros resultados vienen avalados por estudios previos, destacan la ganancia de 10q; este desequilibrio genético, en el que RET se encuentra citogenéticamente localizado (10q11.2), se observa raras veces en otras afecciones cancerosas (datos no mostrados, comunicación personal en proceso). Como esta región citogenética no ha sido previamente descrita en el CC, decidimos buscar posibles alteraciones tisulares y líneas celulares de CC.

Nuestros resultados vinieron a confirmar que la proteína RET se encuentra en la mayoría del epitelio cervical sano; en cambio, el CC y sus lesiones precursoras podrían caracterizarse por una pérdida de expresión de RET, lo cual podría explicarse por dos hipótesis: la presencia de mutaciones puntuales (inactivantes) o una regulación negativa a través de mecanismos epigenéticos. Se observó ausencia de mutaciones puntuales en RET en células cancerosas, lo cual está avalado por estudios previos que indican que la ausencia de mutaciones en RET es un evento extremadamente raro fuera de los tumores neuroendocrinos.<sup>14</sup>

Alternativamente, se ha demostrado que un papel epigenético aberrante (metilación) en las islas CpG del promotor del gen RET se asocia al cáncer colorrectal,<sup>18,21,22</sup> y los autores sugieren que RET podría considerarse un gen supresor de tumores. Además, tanto el CC como el cáncer colorrectal presentan metilación en la misma región del promotor de RET, lo cual implica la ausencia de expresión de RET.

De acuerdo con nuestros resultados, es evidente que la falta de expresión o inactivación de RET podría ser favorable para la carcinogénesis cervical, lo cual estaría ocurriendo por un evento epigenético aberrante. Si esta alteración molecular se ha identificado como de mal pronóstico para pacientes con cáncer colorrectal,<sup>21,22</sup> especulamos con la posibilidad de que pudiese suceder algo similar en pacientes con CC. Se deben llevar a cabo estudios de cohortes para confirmar esta afirmación. En líneas generales, toda esta evidencia indica que la función de RET como gen supresor de tumores

está asociada al mecanismo molecular implicado en la metilación de su región promotora.

Curiosamente, se han observado resultados equivalentes para la proteína 1 de unión al retinol celular en el CC y en el cáncer de laringe, donde la falta de expresión del gen está consistentemente asociada a la metilación de su promotor.<sup>23-25</sup> Estas evidencias refuerzan la idea de que el estado de metilación del gen podría estar altamente relacionado con la carcinogénesis cervical. En cualquier caso, los datos de las líneas celulares podrían indicar indirectamente la metilación aberrante del promotor de RET, lo cual avalaría los hallazgos en el cáncer colorrectal. Es necesario realizar una evaluación completa del promotor para determinar si existe otra región que medie específicamente la regulación de la expresión de RET en el epitelio cervical. Por ejemplo, el carcinoma medular de tiroides está asociado a la hipometilación.<sup>25</sup> No descartamos la posible influencia de otros factores moleculares, como la ausencia de ligandos, que ha sido descrita en pacientes con cáncer colorrectal<sup>18,26</sup> y que podría contribuir a la carcinogénesis. Aunque los métodos computacionales han sugerido que existe un posible vínculo entre el RET y la infección por VPH, en la actualidad no hay evidencia que lo avale;<sup>27</sup> no obstante, no puede descartarse un papel viral. Podría plantearse la hipótesis de que la inactivación del RET por metilación aberrante en el CC y sus precursores pueda ser una consecuencia tardía (como un evento secundario) de la infección por VPH. En cualquier caso, la metilación del promotor de RET es una alteración molecular *in vivo* asociada al CC.

Algunas limitaciones del presente trabajo son el muy pequeño tamaño de las biopsias (que dificulta técnicamente el análisis del estado de metilación), la falta de un análisis completo de todas las islas CpG del RET y la falta de seguimiento de las pacientes. Se requieren más estudios sobre este tema para definir el papel del gen RET en el CC.

## Conclusiones

En resumen, la inactivación de RET en el CC y sus lesiones precursoras está vinculada con mecanismos de control epigenético a través de la metilación anormal de su promotor, y las mutaciones puntuales en el gen RET son poco frecuentes. En este contexto, RET podría representar un nuevo gen supresor de tumores en células de CC.

## Agradecimientos

Este trabajo fue presentado como requisito parcial para la obtención del grado de Doctorado en Ciencias Biológicas en el Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México. Fue parcialmente apoyado por el IMSS antes y durante la pandemia de COVID-19. Durante la realización de este trabajo, M.A. Martínez-Castillo fue beneficiaria de una beca del CONACYT.

## Financiamiento

Este trabajo fue parcialmente financiado por el IMSS.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## Consideraciones éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad, consentimiento informado y aprobación ética.** El estudio no involucra datos personales de pacientes ni requiere aprobación ética. No se aplican las guías SAGER.

**Declaración sobre el uso de inteligencia artificial.** Los autores declaran que no utilizaron ningún tipo de inteligencia artificial generativa para la redacción de este manuscrito.

## Bibliografía

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127:2893-917.
2. Wani K, Huilgol N, Hongyo T, Izumi M, Takahashi T, Hara T, et al. Genetic alterations in the coding region of the bak gene in uterine cervical carcinoma. *Br J Cancer*. 2003;88:1584-6.
3. Mitra A, Murty V, Li R, Pratap M, Chaganti RS, Houldsworth J, et al. Allelotype analysis of cervical carcinoma. *Cancer Res*. 1994;54:4481-7.
4. Kloth J, Oosting J, Wezel T, Szuhai K, Van Roozendaal K, Speel EJ, et al. Combined array-comparative genomic hybridization and single-nucleotide polymorphism-loss of heterozygosity analysis reveals complex genetic alterations in cervical cancer. *BMC Genomics*. 2007;8:1-13.
5. Dellas A, Torhorst J, Jiang F, Probst S, Moch H, Gudat F, et al. Prognostic value of genomic alterations in invasive cervical squamous cell carcinoma of clinical stage IB detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*. 1999;59:3475-9.
6. Hidalgo A, Schewe C, Petersen S, Schluns K, Wienberg J, Hermann K, et al. Human papilloma virus status and chromosomal imbalances in primary cervical carcinomas and tumour cell lines. *Eur J Cancer*. 2000;36:542-8.
7. Hidalgo A, Monroy A, Arana R, Cuadros M, Ulloa L, Herreros B, et al. Chromosomal imbalances in four new uterine cervix carcinoma derived cell lines. *BMC Cancer*. 2003;3:8.
8. Rao PH, Arias-Pulido H, Lu XY, Harris CP, Vargas H, Zhang FF, et al. Chromosomal amplifications, 3q gain and deletions of 2q33-q37 are the frequent genetic changes in cervical carcinoma. *BMC Cancer*. 2004;4:5-13.
9. Vázquez-Mena O, Medina-Martínez I, Juárez-Torres E, Paredes-García P, Herrera LA, Bermúdez M, et al. Amplified genes may be overexpressed, unchanged, or downregulated in cervical cancer cell lines. *PLoS One*. 2012;7:e32667.
10. Yang YC, Shyong WY, Chang MS, Wu CW, Chiou YY, Sheu JC, et al. Frequent gain of copy number on the long arm of chromosome 3 in human cervical adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001;131:48-53.
11. Kato S, Subbiah V, Marchlik E, Rozeman EA, Verweij J, Wexler LH, et al. RET aberration in diverse cancers: next-generation sequencing of 4871 patients. *Clin Cancer Res*. 2017;23:1988-97.
12. Paratala BS, Chung JH, Williams CB, Yilmazel B, Petrosky W, Williams K, et al. RET rearrangement are actionable alterations in breast cancer. *Nat Commun*. 2018;9:4821.
13. Mendes Oliveira D, Grillone K, Mignogna C, Salazar R, Karachaliou N, Rosell R, et al. Next-generation sequencing analysis of receptor-type tyrosine kinase genes in surgically resected colon cancer: identification of gain-of-function mutations in the RET proto-oncogene. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37:84.
14. Mulligan LM. GDNF and the RET receptor in cancer: new insights and therapeutic potential. *Front Physiol*. 2019;9:1873.
15. Mulligan LM. RET revisited: expanding the oncogenic portfolio. *Nat Rev Cancer*. 2014;14:173-86.
16. Takahashi M, Kawai K, Asai N. Roles of the RET proto-oncogene in cancer and development. *JMA J*. 2020;3:175-81.
17. Sharma BP, Saranath D. RET gene mutations and polymorphisms in medullary thyroid carcinomas in Indian patients. *J Biosci*. 2011;36:603-11.
18. Luo Y, Tsuchiya KD, Park DI, Lutterbaugh J, Skaar TC, Schaeffer D, et al. RET is a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene*. 2013;32:2037-47.
19. International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory. Lyon, France; 2018. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/>.
20. Ager B, Gallardo-Rincón D, Cantú D, Lara E, Alvarado-Cabrero I, Mohar A, et al. Advancing clinical research globally: cervical cancer research network from Mexico. *Int J Gynecol Cancer*. 2021;31:775-8.
21. Draht M, Smits K, Tournier B, Jo P, van Engeland M, de Haan R, et al. Analysis of RET promoter CpG island methylation using methylation-specific PCR (MSP), pyrosequencing, and methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM): impact on stage II colon cancer patient outcome. *Clin Epigenetics*. 2016;8:44.
22. Draht M, Smits K, Tournier B, de Haan R, van Engeland M, Meijerink W, et al. Promoter CpG island methylation of RET predicts poor prognosis in stage II colorectal cancer patients. *Mol Oncol*. 2014;8:679-88.
23. Mendoza-Rodríguez M, Arreola H, Valdivia R, Pérez-Plasencia C, Salgado-Albarrán M, Herrera LA, et al. Cellular retinol binding protein 1 could be a tumor suppressor gene in cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6:1817-25.
24. Peralta R, Valdivia A, Alvarado-Cabrero I, Juárez E, Gariglio P, Mohar A, et al. Correlation between expression of cellular retinol-binding protein 1 and its methylation status in larynx cancer. *J Clin Pathol*. 2012;65:46-50.
25. Shakiba E, Movahedi M, Majd A, Azizi S, Akhavan-Niaki H, Rahnama M, et al. Investigating the expression and promoter methylation of RET gene in patients with medullary thyroid cancer with unmutated RET. *J Cell Physiol*. 2019;234:16304-11.
26. Negulescu AM, Mehlen P. Dependence receptors — the dark side awakens. *FEBS J*. 2018;285:3909-24.
27. Zhu L, Su F, Xu Y, Zou Q. Network-based method for mining novel HPV infection related genes using random walk with restart algorithm. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864:2376-83.