



*Diseño in silico de primers para el gen GSTM1 en diagnóstico de Cáncer de Pulmón*

*In silico design of primers for the GSTM1 gene in the diagnosis of lung cancer*

*Desenho in silico de primers para o gene GSTM1 no diagnóstico de câncer de pulmão*

Kevin Joel Guevara-Guevara <sup>I</sup>  
kguevara4730@uta.edu.ec  
<https://orcid.org/0000-0001-9601-6071>

Luis Felipe Varela-Polit <sup>II</sup>  
luisvarelapo@uide.edu.ec  
<https://orcid.org/0000-0002-4609-3439>

Daniel Alfonso Cabrera-Valle <sup>III</sup>  
da.cabrera@uta.edu.ec  
<https://orcid.org/0000-0002-6685-4178>

Cristian Fernando Galarza-Galarza <sup>IV</sup>  
cf.galarza@uta.edu.ec  
<https://orcid.org/0000-0001-7890-5043>

**Correspondencia:** <https://orcid.org/0000-0001-9601-6071>

Ciencias de la Salud  
Artículo de Investigación

\* **Recibido:** 10 de julio de 2023 \* **Aceptado:** 30 de julio de 2023 \* **Publicado:** 31 de agosto de 2023

- I. Ingeniero Bioquímico, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador
- II. Médico General, Universidad Internacional del Ecuador, Quito, Ecuador
- III. Máster, Magister, Ingeniero, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador
- IV. Máster, Ingeniero, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador



## Resumen

El cáncer de pulmón es una de las enfermedades oncológicas más prevalentes y mortales en todo el mundo. A medida que avanzamos en la comprensión de los mecanismos subyacentes de esta enfermedad, es evidente que la detección temprana y precisa es crucial para brindar el tratamiento efectivo.

La familia de enzimas de transferencia de glutatión (GST) está involucrada en el metabolismo de una amplia variedad de carcinógenos, incluyendo aquellos que están asociados con el cáncer de pulmón. El gen GST1 (glutatión S-transferasa 1) es miembros de esta familia, y su expresión se ha relacionado con el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón.

Los primers in silico son secuencias cortas de ADN que se diseñan para unirse y amplificar regiones específicas de un gen. El objetivo del presente estudio fue diseñar primers para amplificar de forma precisa la sección ubicada entre el exón 5 y 7 donde se identificó un polimorfismo de nucleótido único (SNP), cuyos alelos generan susceptibilidad para desarrollar cáncer de pulmón.

Los primers fueron diseñados empleando Primer3Plus y Primer-BLAST y analizados con OligoAnalyzer. De los 10 pares de primers diseñados, seleccionamos a los dos mejores de acuerdo con el tamaño del amplicón (148 y 155 pb) y la tendencia a formar dímeros. Con el fin de validar los primers diseñados se realizaron pruebas de PCR in silico mediante UGENE comprobando que el diseño de los primers fue exitoso. Se concluyó que fue posible diseñar y validar primers in silico específicos para el gen GTS1.

**Palabras Clave:** PCR; Primers; In Silico; Cáncer; Bioinformática.

## Abstract

Lung cancer is one of the most prevalent and deadly cancer diseases worldwide. As we progress in understanding the underlying mechanisms of this disease, it is clear that early and accurate detection is crucial to providing effective treatment.

The glutathione transfer (GST) family of enzymes is involved in the metabolism of a wide variety of carcinogens, including those that are associated with lung cancer. The GST1 gene (glutathione S-transferase 1) is a member of this family, and its expression has been linked to the risk of developing lung cancer.

In silico primers are short DNA sequences that are designed to bind to and amplify specific regions of a gene. The objective of this study was to design primers to accurately amplify the section

located between exon 5 and 7 where a single nucleotide polymorphism (SNP) was identified, whose alleles generate susceptibility to develop lung cancer.

Primers were designed using Primer3Plus and Primer-BLAST and analyzed with OligoAnalyzer. Of the 10 primer pairs designed, we selected the best two according to the size of the amplicon (148 and 155 bp) and the tendency to form dimers. In order to validate the designed primers, in silico PCR tests were carried out using UGENE, verifying that the design of the primers was successful. It was concluded that it was possible to design and validate specific in silico primers for the GTS1 gene.

**Keywords:** PCR; primers; In Silico; Cancer; Bioinformatics.

### **Resumo**

O câncer de pulmão é uma das doenças cancerígenas mais prevalentes e mortais em todo o mundo. À medida que avançamos na compreensão dos mecanismos subjacentes desta doença, fica claro que a detecção precoce e precisa é crucial para fornecer um tratamento eficaz.

A família de enzimas de transferência de glutatona (GST) está envolvida no metabolismo de uma ampla variedade de carcinógenos, incluindo aqueles associados ao câncer de pulmão. O gene GST1 (glutathione S-transferase 1) é um membro desta família e a sua expressão tem sido associada ao risco de desenvolver cancro do pulmão.

Primers in silico são sequências curtas de DNA projetadas para se ligar e amplificar regiões específicas de um gene. O objetivo deste estudo foi projetar primers para amplificar com precisão a seção localizada entre os éxons 5 e 7 onde foi identificado um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), cujos alelos geram suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer de pulmão.

Primers foram projetados usando Primer3Plus e Primer-BLAST e analisados com OligoAnalyzer. Dos 10 pares de primers desenhados, selecionamos os dois melhores de acordo com o tamanho do amplicon (148 e 155 pb) e a tendência de formar dímeros. Para validar os primers desenhados, foram realizados testes de PCR in silico utilizando UGENE, verificando se o desenho dos primers foi bem sucedido. Concluiu-se que foi possível desenhar e validar primers in silico específicos para o gene GTS1.

**Palavras-chave:** PCR; primários; Em sílico; Câncer; Bioinformática.

### **Introducción**

La familia de enzimas de transferencia de glutatión (GST) se encargan de catalizar la conjugación de la forma reducida de glutatión (GSH), eliminando así compuestos electrofílicos endógenos y exógenos, las reacciones que llevan a cabo son desintoxicación de fase II, aquellos compuestos producidos por el estrés oxidativo, sustratos exógenos como medicamentos, productos intermediarios industriales, pesticidas, herbicidas, contaminantes del ambiente y carcinógenos (Dulhunty, Board, Beard, & Casarotto, 2017). Por lo tanto, dichas enzimas tienen la importante función de proteger al organismo vivo contra los efectos dañinos generados por las sustancias tóxicas con las que entra en contacto.

Si existen deficiencias de GST determinadas genéticamente, estas provocan diferencias en la desintoxicación de los xenobióticos, entre ellos los metabolitos reactivos de los fármacos, provocando incapacidad del metabolismo (Dasari, Ganjayi, Oruganti, Balaji, & Meriga, 2017). Por lo tanto, el organismo vivo tendrá un mayor riesgo de toxicidad, exponiéndose a los xenobióticos y drogas, es así como, el estudio de dichas enzimas es de interés para la industria farmacéutica (El-Deek et al., 2021).

El gen GSTM1 codifica un glutatión S-transferasa perteneciente a la clase  $\mu$ , con funciones de desintoxicación de compuestos electrofílicos, carcinógenos, fármacos terapéuticos, toxinas de ambiente y productos del estrés oxidativo ((NCBI)[Internet], 2021a). Se expresa tanto en el hígado como en los testículos, su presencia trae muchos beneficios al individuo, pero al igual que otros genes su delección acarrea posibles enfermedades (Türkan & Atalar, 2021).

Los SNP's son los tipos de variaciones en la secuencia de ADN más comunes, representan alrededor del 90% de los polimorfismos de ADN en humanos (Abdelhalim et al., 2020). El polimorfismo del gen GST1 afecta principalmente la respuesta de los pacientes a las terapias contra el cáncer y la desintoxicación contra sustancias químicas tóxicas, ya que estas se encargan de metabolizar los fármacos. En este gen, la sección ubicada entre el exón 5 y 7 donde existe un SNP, cuya sustitución de una C por una G en la posición 534 da como resultado los alelos GSTM1\*A y GSTM1\*B que poseen una lisina y una asparagina respectivamente en la posición 172. Y un tercer alelo GSTM1\*0 denominado alelo nulo generado por una delección homocigota, este se considera inactivo, y afecta la actividad enzimática generando susceptibilidad a desarrollar cáncer de pulmón (Wang, Li, Lin, Song, & Deng, 2016).

Para amplificar el ADN es indispensable la utilización de secuencias cortas de ácidos nucleicos denominados primers, las ADN polimerasas utilizan dichas secuencias con el fin de agregar los

nuevos nucleótidos a la cadena de ADN existente, la replicación empieza por el extremo 3' terminal del primer el mismo que copia la hebra opuesta (SfI). Por tal motivo, para una PCR exitosa, la amplificación debe ser específica y sensible, lo cual se logra mediante la adición de oligonucleótidos sintetizados químicamente y cationes que estabilizan la reacción (Gupta, 2019). Para el análisis, diseño y validación de primers, se dispone de varios enfoques, desde procesos moleculares in vitro hasta la aplicación de potentes algoritmos computacionales (Hendling, Barišić, & journal, 2019). En este segundo enfoque, las herramientas bioinformáticas permiten evaluar las condiciones de diseño y funcionales de estos, existe un amplio campo para el diseño de primers in silico, puesto que, este proceso ofrece a los investigadores un entorno de desarrollo ágil, flexible y eficiente, evitando el desperdicio de recursos para cuando se pruebe los primers in vitro (Orozco-Ugarriza, Anaya, & Martinez, 2016).

Utilizamos los programas Primer-Blast y Primer3Plus y efectuamos dos diseños, en el primero aplicamos los parámetros de diseño por defecto y otro diseño con parámetros más rigurosos ya que serán aplicados en diagnóstico. Se introdujo concentraciones de específicas de cationes divalentes y dNTPs, la fórmula de la concentración de sal y la tabla de parámetros termodinámicos se seleccionó de acuerdo con (SantaLucia Jr, 1998). Estos primers fueron validados mediante OligoAnalyzer para verificar que se cumplan los parámetros de diseño y verificar la sensibilidad de estos. Verificamos que el producto de la PCR cumpla con los requerimientos y los validamos haciendo una correlación bibliográfica.

## **Materiales y métodos**

Con el fin de identificar la relación del gen GSTM1 con el cáncer de pulmón se consultó en las bases de datos MalaCards y Harmonizome. En Malacards, se ingresó en el sitio web y se introdujo el nombre de la enfermedad “lung cancer”, una vez generado los resultados en la parte inferior se encontró la sección de genes involucrados, entre los cuales se encontró el gen de interés GSTM1 con su respectiva puntuación.

En la base de datos Harmonizome, se escogió la búsqueda Gene sets y se introdujo el nombre de la enfermedad “lung cancer”, la plataforma generó varios resultados sobre los genes involucrados, entre los cuales también se encontró el gen GSTM1 con su respectiva puntuación.

Para obtener la secuencia nucleotídica del gen GSTM1, el cual está relacionado con el cáncer de pulmón, se utilizó la base de datos GenBank, se ingresó a la web de la base de datos y se introdujo

el nombre del gen (GSTM1) en la barra de búsqueda. Se listaron 3 secuencias Refseq, es decir 3 transcritos con código de acceso NM\_000561.4, NM\_146421.3 y XM\_005270782.5. Se escogió la secuencia NM\_000561.4 puesto que era una secuencia curada además de ser la más actual a la fecha de consulta. Para determinar la zona de interés se realizó una búsqueda bibliográfica sobre los sitios donde aparece el polimorfismo del gen GSTM1. Se consultó en la base de datos de polimorfismos del NCBI y se correlacionó con los alineamientos locales efectuados con la herramienta BLAST.

Una vez que se identificó la zona de interés para la amplificación en la secuencia, se procedió al diseño de los primers mediante el software Primer-BLAST y Primer3Plus, se ingresó los parámetros de diseño y se mantuvo los valores por defecto de concentración de cationes monovalentes y divalentes, concentración de dNTPs. Se seleccionó la fórmula de corrección de sal y la tabla de parámetros termodinámicos de acuerdo con lo que indica (BIOSOFT, 2021). Se realizó el análisis de compatibilidad, a través del programa MultiPLX 2.1, en donde se ingresó un archivo .txt con los primers y sus respectivos amplicones, se ingresó los parámetros de cálculo y se indicó los tipos de primers que se generaron.

Se utilizó la plataforma OligoAnalyzer, donde se evaluó la formación de dímeros mediante la cuantificación de la energía de formación de las reacciones a través de la energía libre de Gibbs, así también, se efectuó el análisis de las características principales de diseño de los primers. Se introdujo los primers en la casilla destinada para la secuencia de en dirección 5' - 3', el conjunto de parámetros se modificó para qPCR y las concentraciones se mantuvieron por defecto.

Para determinar la especificidad de los primers se utilizó la herramienta BLAST del NCBI, donde, mediante un alineamiento de la secuencia del primer contra las bases de datos de diferentes organismos, se buscó determinar la especificidad inter-especies e intra-especie, mediante la evaluación de los alineamientos obtenidos.

Finalmente se realiza la validación in silico de la PCR con los primers diseñados, para lo cual se utilizó la herramienta para el control de calidad y especificidad Beacon Desing Free Edition. Aquí se obtuvieron valores de identidad y E-Value presentados en Nucleotide-BLAST. Estos datos se los procesó con Ugene, donde se calcula y presenta, las dificultades que podrían tener los primers en la PCR, la región amplificada, longitud del amplicón y la temperatura de annealing (Branco, Choupina, & biotechnology, 2021).

## Resultados

Las bases de datos que contienen información sobre enfermedades humanas son un recurso integral de conocimiento sobre genes y proteínas que permiten identificar relaciones entre entidades biológicas, así como formular hipótesis novedosas basadas en datos para validación experimental (Rouillard et al., 2016). Estas bases de datos exponen un conjunto de genes importantes relacionados con el cáncer del pulmón, entre los cuales se encontró el gen GSTM1 con una puntuación alta sobre su relación con la enfermedad, estos se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Relación del gen GSTM1 con el cáncer de pulmón

| Gen   | Base de datos | Score   |
|-------|---------------|---------|
| GSTM1 | Malacards     | 47,18   |
|       | Harmonizome   | 1,87423 |

La secuencia nucleotídica del Gen GSTM1 es de interés debido a que su polimorfismo tiene un posible vínculo con una mayor susceptibilidad a desarrollar especialmente cáncer de pulmón. Se efectuó un diseño con parámetros modificados a conveniencia con el fin de mejorar la especificidad y sensibilidad de los primers. Se obtuvieron un total de seis pares de primers, dos pares como control y los otros pares de primers para su utilización en diagnóstico mediante las herramientas señaladas anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2 y 3.

**Tabla 2.** Primers obtenidos con parámetros por defecto de Primer Blast.

| Primer        | Inici | Longit | Tm   | GC | Sel | Secuencia        |
|---------------|-------|--------|------|----|-----|------------------|
| Forward       | 472   | 20     | 59,6 | 55 | 5   | TCAGAGTTTCTGGGGA |
| Reverse       | 600   | 20     | 60,3 | 55 | 5   | CAGATTTGGGAAGGCG |
| <b>Pair</b>   | 4     |        |      |    |     |                  |
| <b>Pair</b>   | 2     |        |      |    |     |                  |
| <b>Amplic</b> | 129   |        |      |    |     |                  |

**Tabla 3.** Primers obtenidos con parámetros por defecto de Primer3Plus.

| Primer           | Inicio | Longitud | Tm   | GC% | Self | Secuencia            |
|------------------|--------|----------|------|-----|------|----------------------|
| Forward          | 388    | 20       | 59,8 | 50  | 2    | CTGGGCATGATCTGCTACAA |
| Reverse          | 573    | 20       | 60,8 | 50  | 1    | GGGCTCAAATATACGGTGGA |
| <b>Pair any:</b> | 3      |          |      |     |      |                      |
| <b>Pair end:</b> | 1      |          |      |     |      |                      |



**Amplicón** 186

En la tabla 4 y 5 se muestra los primers diseñados con Primer-Blast y Primer3Plus para diagnóstico, estas presentan las mejores características, tanto any, self, pair any y pair end presentan valores bajos, lo cual indica una baja probabilidad de formar dímeros y esto se ve reflejado en el mejoramiento de la especificidad.

**Tabla 4.** Primers para diagnóstico diseñados en Primer-Blast.

| <b>Primer</b>    | <b>Inicio</b> | <b>Longitud</b> | <b>Tm</b> | <b>GC%</b> | <b>Self</b> | <b>Secuencia</b>     |
|------------------|---------------|-----------------|-----------|------------|-------------|----------------------|
| Forward          | 417           | 20              | 57,17     | 40         | 2           | TGAGAAACTGAAGCCAAAGT |
| Reverse          | 564           | 20              | 59,27     | 50         | 1           | TATACGGTGGAGGTCAAGGA |
| <b>Pair any:</b> | 3             |                 |           |            |             |                      |
| <b>Pair end:</b> | 1             |                 |           |            |             |                      |
| <b>Amplicón</b>  | 148           |                 |           |            |             |                      |

**Tabla 5.** Primers para diagnóstico diseñados en Primer3Plus

| <b>Primer</b>    | <b>Inicio</b> | <b>Longitud</b> | <b>Tm</b> | <b>GC%</b> | <b>Self</b> | <b>Secuencia</b>     |
|------------------|---------------|-----------------|-----------|------------|-------------|----------------------|
| Forward          | 417           | 20              | 57,2      | 40         | 2           | TGAGAAACTGAAGCCAAAGT |
| Reverse          | 563           | 19              | 59,4      | 52,6       | 1           | ATACGGTGGAGGTCAAGGA  |
| <b>Pair any:</b> | 3             |                 |           |            |             |                      |
| <b>Pair end:</b> | 1             |                 |           |            |             |                      |
| <b>Amplicón</b>  | 147           |                 |           |            |             |                      |

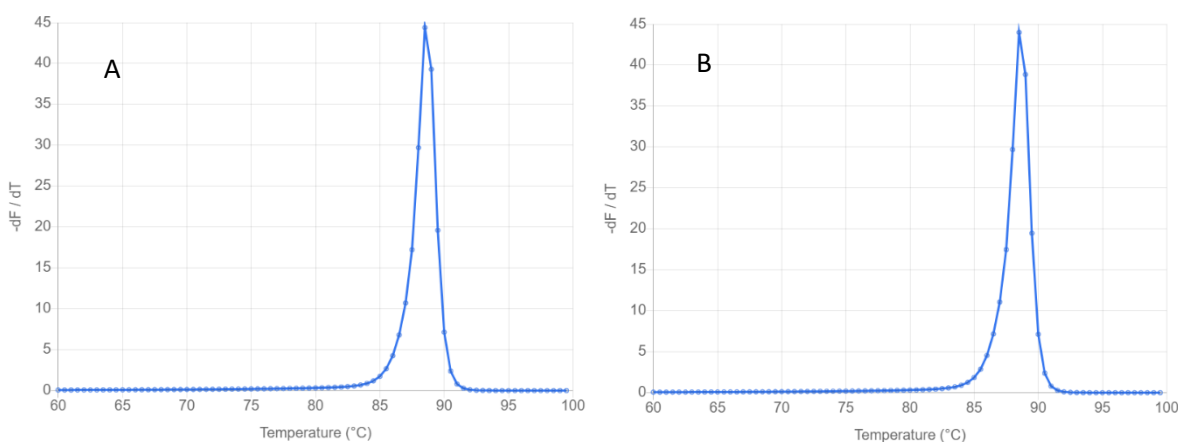
La temperatura de melting (TM) es uno de los parámetros importantes en el diseño de primers, se obtiene usando el método termodinámico, que es la forma más exacta de calcularla mediante el uso de la entalpía, entropía de formación de la hélice, la constante de los gases y la concentración de oligonucleótidos (Bermúdez, 2022). En la tabla 6 se muestran los valores óptimos de la TM.

**Tabla 6.** Temperatura de melting en primers diseñados para diagnóstico

| <b>Primer-Blast</b> |                                    |
|---------------------|------------------------------------|
| <b>Primers</b>      | <b>Temperatura de melting (°C)</b> |
| Forward             | 59,9                               |
| Reverse             | 61,8                               |
| <b>Primer3Plus</b>  |                                    |
| <b>Primers</b>      | <b>Temperatura de melting (°C)</b> |
| Forward             | 59,9                               |
| Reverse             | 62,1                               |

Para evaluar en número de productos de amplificación que se generan, se analiza la curva de fusión. Si la unión es específica debe generarse un solo pico estrecho, lo cual indica que se ha generado el ADN diana de interés; si genera un pico más pequeño a la izquierda puede corresponder a la curva de disociación de los dímeros del primer (Jalali, Zaborowska, & Jalali, 2017).

**Figura 1.-** Curvas de fusión para primers de uso diagnóstico calculadas en uMELT. A. Curva de fusión del amplicón formado con primers diseñados en Primer-Blast. B. Curva de fusión del amplicón formado con primers diseñados en Primer3Plus



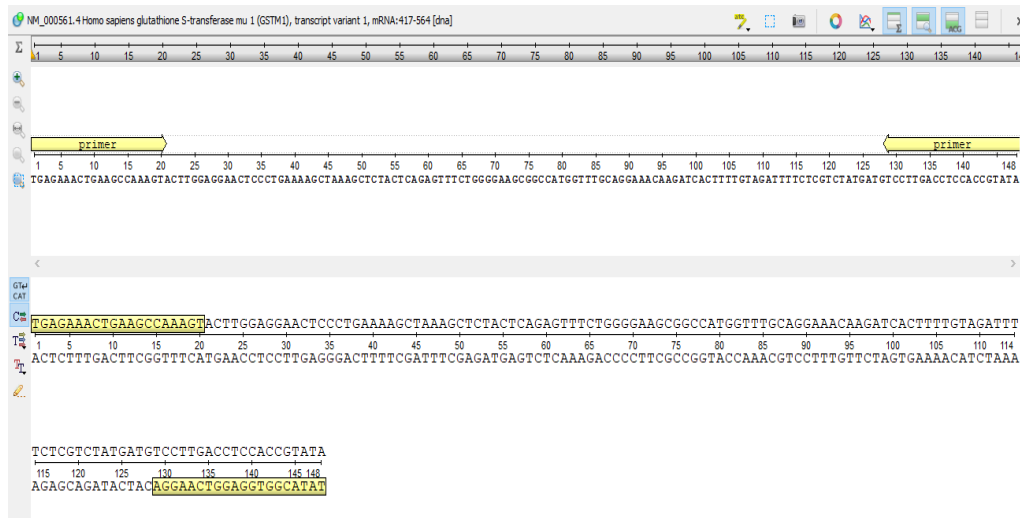
Las estructuras secundarias resultan de las interacciones entre bases dentro del mismo primer o entre dos primers diferentes, la presencia de estas estructuras en los primers debido a las interacciones intermoleculares o intramoleculares pueden generar un rendimiento del producto de la PCR escaso o nulo lo que afecta negativamente la hibridación primer-molde (Roy, 2019).

**Tabla 7.** Estructuras secundarias generadas por primers para uso investigativo software Oligoanalyzer

| Software     | Primer  | Hetero dimer |            | Self dimer |            | Hairpin    |   |
|--------------|---------|--------------|------------|------------|------------|------------|---|
|              |         | $\Delta G$   | Base pairs | $\Delta G$ | Base pairs | $\Delta G$ | # |
| Primer-Blast | Forward | -3,53        | 3          | -6,34      | 4          | -2,39      | 2 |
|              | Reverse |              |            | -3,61      | 2          | -1,16      | 1 |
| Primer3Plus  | Forward | -5,47        | 4          | -5,36      | 4          | -1,49      | 3 |
|              | Reverse |              |            | -3,61      | 2          | -1,16      | 1 |

Mediante la validación in silico se comprueba que los componentes de la reacción de PCR como primers y sondas de nucleótidos, esto permite aceptar o rechazar el par de imprimaciones diseñadas (van Weezep, Kooi, & van Rijn, 2019). Los primers presentaron valores aceptables para la Tm, ya que el diseño se enfocó en obtener la menor afinidad posible por generar dímeros de primers, es decir obtener una alta especificidad, lo cual se confirmó al procesar la PCR in silico.

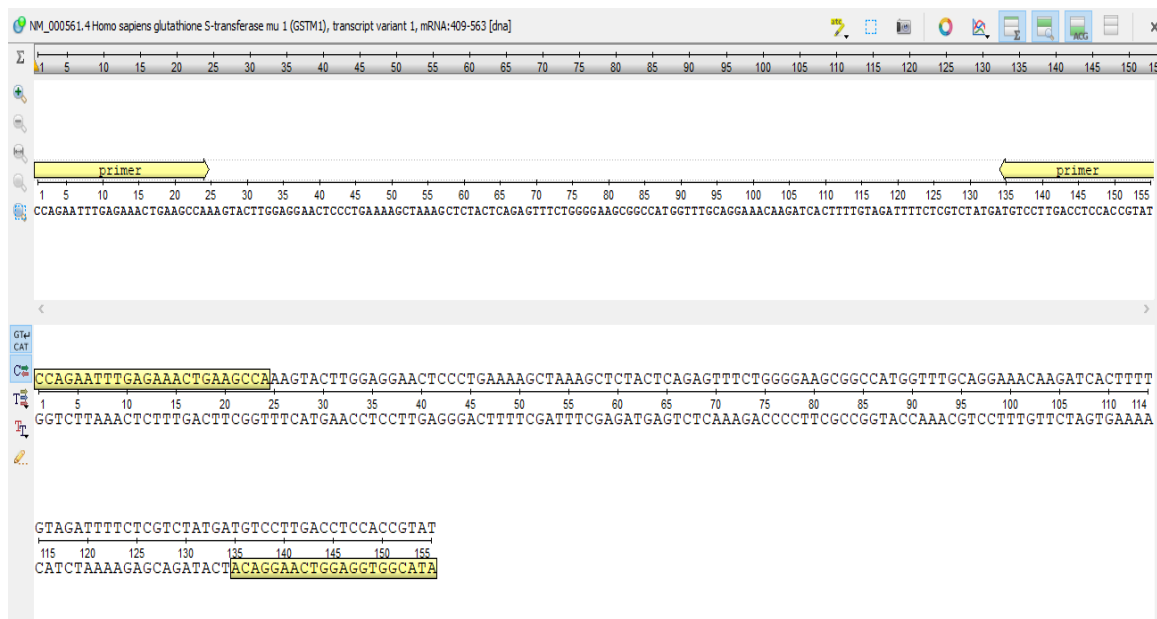
**Figura 2.** Amplicón obtenido mediante PCR in silico con primers diseñados en Primer-Blast



**Tabla 8.** Características del producto de PCR en primers para uso diagnóstico diseñados en Primer-Blast

| Región  | Longitud (pb) | Ta (°C) | Tm primer forward (°C) | Tm primer reverse (°C) |
|---------|---------------|---------|------------------------|------------------------|
| 417-564 | 148           | 55,07   | 47,68                  | 51,78                  |

**Figura 3.** Amplicón obtenido mediante PCR in silico con primers diseñados en Primer3Plus



**Tabla 9.** Características del producto de PCR en primers para uso diagnóstico diseñados en Primer3Plus

| Región  | Longitud (pb) | Ta (°C) | Tm primer forward (°C) | Tm primer reverse (°C) |
|---------|---------------|---------|------------------------|------------------------|
| 409-563 | 155           | 56,52   | 53,97                  | 54,36                  |

## Discusión

El Gen GSTM1 presenta un SNP, que origina los alelos GSTM1\*A y GSTM1\*B, por lo tanto, el estudio del polimorfismo del gen GSTM1 es importante, amplificando la zona de interés que comprende entre el exón 5 y 7 de la secuencia NM\_00056 ((NCBI)[Internet], 2021b), esta región abarca la posición nucleotídica 534, con una longitud total de 308 pb que se acotó con los primers diseñados y se amplifica con la PCR. Hay que señalar, que los primers diseñados han sido probados para una PCR in silico convencional, para una qPCR hay que ajustarlos para obtener resultados satisfactorios.

La especificidad de los primers es una de las características más importantes para tener en cuenta en el diseño, esta depende de la longitud y de la TM, si tenemos primers muy pequeños y la TM es muy baja, se generan uniones inespecíficas (SantaLucia Jr, 1998), en nuestros primers se ha encontrado que la longitud de los pares de primers se encuentra entre 19 y 20 bp y la TM esta entre 48–54 °C. Con este resultado, se debe tener en cuenta que para el diseño de primers para una qPCR el rango de la TM óptima se encuentra entre 60 y 64°C con una temperatura ideal de 62°C (Syamsidi, Aanisah, Fiqram, Al Jultri, & Chemistry, 2021). Se aplicó una concentración de 3.5

mM de  $MgCl_2$  lo que aumentó ligeramente la TM, con lo que se confirma la influencia del Magnesio en la reacción.

Según (Orozco-Ugarriza et al., 2016), las secuencias repetitivas internas podrían causar uniones inespecíficas, en los primers diseñados con Primer-Blast encontramos estas secuencias repetitivas. Para el caso del primer forward generado se encuentran 4 bases continuas de Guanina, estas deben evitarse para evitar la disociación completa de la hebra, lo cual reduce la eficiencia de amplificación (Bustin & Huggett, 2017). Por lo que, estos primers no se recomienda sintetizar para la PCR. Los primers que se diseñaron con Primer3Plus no presentaron este problema.

El desafío principal para la amplificación en la PCR es evitar reacciones secundarias que conducen a la formación de productos no específicos (dímeros), ya que estas reacciones reducen la especificidad y sensibilidad de los ensayos (Garafutdinov, Galimova, Sakhabutdinova, & Acids, 2020). Los dos juegos de primers obtenidos presentaron un  $\Delta G$  bajo, lo que garantiza que no se formen dímeros estables. Las horquillas de extremo 3' con un  $\Delta G$  mayor a  $-2$  kcal/mol son tolerables. Los primers diseñados en el software Primer-Blast presentaron horquillas con un extremo 3' más corto que el extremo 5', es decir presentaron horquillas internas con una energía libre de Gibbs mayor a  $-3$  kcal/mol por lo que tampoco representa problemas al momento de la reacción de PCR. Para el caso de las horquillas formadas por los primers diseñados en Primer3Plus, el primer forward presenta horquillas internas con un  $\Delta G$  dentro del rango aceptable, el primer reverse tiene afinidad por formar una sola horquilla formada en el extremo 3' con un  $\Delta G$  mayor a  $-2$  kcal/mol, siendo también aceptable.

El resultado de la PCR in silico, muestra que hemos obtenido el amplicón de interés, además, se observa una curva de fusión uniforme con un único pico estrecho, concluyendo que hay alta especificidad en los primers. Los primers que se han diseñado cumplen con todos los parámetros de diseño y especificidad, por lo que, se recomienda su uso para sintetizarlos y realizar la PCR convencional en el diagnóstico del cáncer de pulmón.

## Conclusiones

La secuencia del gen GSTM1 identificada con el id NM\_000561.4 se la descargó de la base de datos Genbank del NCBI (fecha de acceso 20 de Septiembre de 2021), en esta secuencia se identificó un SNP el mismo que sirvió de guía para delimitar la zona de interés que deseábamos amplificar, los primers diseñados cumplen con los parámetros de diseño y podrían ser sintetizados

y probados en una PCR convencional. Para procesar una qPCR o qRTPCR se debería ajustar los parámetros de acuerdo con las condiciones de la reacción.

Se utilizó software de acceso libre en el presente proyecto, Primer-Blast y Primer3Plus, Oligoanalyzer, Beacon designer free edition y Ugene. Los resultados obtenidos en el presente proyecto se podrían contrastar con otros resultados obtenidos en otras herramientas para diseño de primers, en las que se configure las mismas condiciones de diseño. Estos resultados pueden ser contrastados bibliográficamente para mejorar su validez.

Para complementar el estudio y validar los primers in vitro se deberían realizar pruebas en una PCR convencional usando muestras de ADN humano con pacientes control y diagnosticados con cáncer de pulmón y probar los productos de la PCR mediante electroforesis.

## Referencias

- (NCBI)[Internet], N. C. f. B. I. (2021a). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- (NCBI)[Internet], N. C. f. B. I. (2021b). Nucleotide [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [2021] – . Accession No. NM\_000561.4, Homo sapiens glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1), transcript;. Retrieved from [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM\\_000561.4/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_000561.4/)
- Abdelhalim, D. M., Albkrye, A. M., Salih, M. A., Abodlaa, A., Elnasri, H. A., & Khaier, M. A. J. E. J. B. P. S. (2020). In silico analysis of a single nucleotide polymorphism (SNPS) in human GSTM1 gene associated with cancer development. 7(1), 514-521.
- Bermúdez, G. P. (2022). Biología molecular: ADN recombinante y sus aplicaciones: Editorial El Manual Moderno.
- Branco, I., Choupina, A. J. A. m., & biotechnology. (2021). Bioinformatics: new tools and applications in life science and personalized medicine. 105, 937-951.
- Bustin, S., & Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. Biomolecular Detection and Quantification. In: Elsevier GmbH.
- Dasari, S., Ganjaji, M., Oruganti, L., Balaji, H., & Meriga, B. J. J. D. V. A. R. (2017). Glutathione S-transferases detoxify endogenous and exogenous toxic agents-minireview. 5(5), 00154.

- Dulhunty, A. F., Board, P. G., Beard, N. A., & Casarotto, M. G. (2017). Physiology and pharmacology of ryanodine receptor calcium release channels. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 79, pp. 287-324): Elsevier.
- El-Deek, S. E., Abdel-Ghany, S. M., Hana, R. S., Mohamed, A. A., El-Melegy, N. T., & Sayed, A. A. J. M. B. R. (2021). Genetic polymorphism of lysyl oxidase, glutathione S-transferase M1, glutathione-S-transferase T1, and glutathione S-transferase P1 genes as risk factors for lung cancer in Egyptian patients. 48, 4221-4232.
- Garafutdinov, R. R., Galimova, A. A., Sakhabutdinova, A. R. J. N., Nucleotides, & Acids, N. (2020). The influence of quality of primers on the formation of primer dimers in PCR. 39(9), 1251-1269.
- Gupta, N. J. J. o. c. (2019). DNA extraction and polymerase chain reaction. 36(2).
- Hendling, M., Barišić, I. J. C., & journal, s. b. (2019). In-silico design of DNA oligonucleotides: challenges and approaches. 17, 1056-1065.
- Jalali, M., Zaborowska, J., & Jalali, M. (2017). The polymerase chain reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. In *Basic science methods for clinical researchers* (pp. 1-18): Elsevier.
- Orozco-Ugarriza, M. E., Anaya, P. F., & Martinez, Y. O. J. R. R. d. I. A. y. D. S. (2016). VALIDACIÓN In silico DE OLIGONUCLEÓTIDOS-PRIMERS PARA LA DETECCIÓN ESPECIFICA DE Salmonella spp. MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA. 1(1), 42-50.
- Rouillard, A. D., Gundersen, G. W., Fernandez, N. F., Wang, Z., Monteiro, C. D., McDermott, M. G., & Ma'ayan, A. J. D. (2016). The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. 2016.
- Roy, D. G. (2019). A new algorithm for primer design. The University of Western Ontario (Canada),
- SantaLucia Jr, J. J. P. o. t. N. A. o. S. (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. 95(4), 1460-1465.
- SfI, H. Primers were designed using the Beacon designer™ software (Premier Biosoft).
- Syamsidi, A., Aanisah, N., Fiqram, R., Al Jultri, I. J. J. o. T. P., & Chemistry. (2021). Primer Design and Analysis for Detection of mecA gene. 5(3), 245-253.
- Türkan, F., & Atalar, M. N. (2021). The toxicological impact of some agents on glutathione S-transferase and cholinesterase enzymes. In *Toxicology* (pp. 281-290): Elsevier.

- van Weezep, E., Kooi, E. A., & van Rijn, P. A. J. J. o. v. m. (2019). PCR diagnostics: In silico validation by an automated tool using freely available software programs. 270, 106-112.
- Wang, M., Li, Y., Lin, L., Song, G., & Deng, T. J. M. n. (2016). GSTM1 null genotype and GSTP1 Ile105Val polymorphism are associated with Alzheimer's disease: a meta-analysis. 53, 1355-1364.

© 2023 por los autores. Este artículo es de acceso abierto y distribuido según los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).