



**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de bacteriología**

Uso de Aptámeros para el Diagnóstico de Leishmania

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Trabajo de grado
Bogotá, septiembre 2022**



Uso de Aptámeros para el Diagnóstico de Leishmania

Karen Lorena Hurtado Ramírez

Heidy Tatiana Moreno Bautista

Asesora

MSc. Sandra Monica Estupiñan Torres

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado

Bogotá, septiembre 2022



Aptámeros para el Diagnóstico de Leishmania

Meritoria: _____

Laureada: _____

Aprobada: _____

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Trabajo de grado
Bogotá, septiembre 2022

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo primeramente a Dios que es el que nos ha permitido llegar hasta acá, a nuestros familiares , ya que ellos fueron un apoyo incondicional tanto económico ,como moral lo que los convierte en una parte fundamental de este logro obtenido.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecemos a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por abrirnos sus puertas y permitirnos ser parte de la institución y en ella formarnos como profesionales, de igual manera a cada docente que nos brindó su conocimiento el cual nos permite hoy culminar este proceso.

Agradecemos a la doctora Sandra Monica Estupiñan Torres, docente asesora interna de este trabajo de grado, que con su dedicación y paciencia nos orientó para su elaboración.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción

1. Antecedentes

2. Marco teórico

2.1 Leishmaniasis

2.1.1 Leishmaniasis Cutánea

2.1.2 Leishmaniasis Mucocutánea

2.1.3 Leishmaniasis Visceral

2.1.4 Diagnóstico

2.1.5 Tratamiento

2.2 Aptámeros

2.2.1 Estructura y Propiedades

2.2.2 Aplicaciones

2.2.2.1 Aptámeros de ADN bacteriano

2.2.2.2 Aptámeros como agentes terapéuticos

2.2.2.3 Aplicaciones terapéuticas basadas en aptámeros para la inhibición de la formación de biopelículas

2.2.2.4 Aptámeros para la inhibición de toxinas microbianas

2.2.2.5 Aptámeros como vehículos de suministro intracelular

2.2.2.6 Aplicación de Aptámeros en el tratamiento de infecciones virales

2.2.2.7 Aplicación de aptámeros en el tratamiento de infecciones parasitarias

2.3 Principios de las tecnologías de detección basada en aptámeros

2.3.1 Ensayo de oligonucleótidos ligados a enzimas (ELONA)

2.3.2 Ensayo de flujo lateral basado en aptámeros (ALFA)

2.3.3 Aptasensor

2.3.4 Fluorofotometría basada en aptámeros

2.3.5 Ensayo de amplificación basado en la captura de patógenos mediada por aptámeros

2.3.6 Aptámeros aplicados para la detección de patógenos

2.3.6.1 Virus

2.3.6.2 Bacterias

2.3.6.3 Hongos

2.3.6.4 Parásitos

2.3.7 Potencial de la tecnología de aptámeros en la terapéutica de enfermedades transmisibles

2.3.8 Control de Patógenos

6.3.9 Terapia Dirigida

2.3.10 Mejora del Sistema Inmunológico

3. Tipo de Investigación y Metodología

3.1 Universo y Población

3.2 Muestra

3.3 Metodología

4. Resultados y discusión

5. Conclusiones

6. Referencias

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo de vida leishmania spp
- Figura 2. Lesión de leishmaniasis cutánea
- Figura 3. Lesión de leishmaniasis cutánea diseminada
- Figura 4. Lesión de leishmaniasis cutánea difusa
- Figura 5. Lesión de Leishmaniasis cutánea atípica
- Figura 6. Lesión de Leishmaniasis mucocutánea
- Figura 7. Lesión de Leishmaniasis visceral
- Figura 8. Esquema del funcionamiento de los aptámeros
- Figura 9. Efecto del aptámero como agente anti-biopelícula
- Figura 10. Función de los aptámeros frente a toxinas bacterianas
- Figura 11. Aplicaciones terapéuticas de los aptámeros
- Figura 12. Principios ELONA
- Figura 13. Esquema de alfa
- Figura 14. Biosensores con aptámeros
- Figura 15. Sondas aptámeras marcadas con fluoróforo
- Figura 16. Aplicación de aptámeros en el control de infecciones por patógenos
- Figura 17. Aplicación de aptámeros en la mejora de la inmunidad del huésped durante la infección por patógenos
- Figura 18. Totalidad de documentos revisados y seleccionados
- Figura 19. Idiomas considerados en la búsqueda bibliográfica
- Figura 20. Años de los artículos utilizados

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aptámeros aprobados para enfermedades

Tabla 2. Aptámeros para el tratamiento de infecciones virales

Tabla 3. Aptámeros representativos para la detección de virus

Tabla 4. Aptámeros representativos para la detección de bacterias



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

USO DE APTÁMEROS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIA

RESUMEN

Según la OMS, la Leishmaniasis es una enfermedad que afecta aproximadamente entre 700.000 y 1 millón de personas anualmente. Colombia se encuentra entre los 10 países que durante el 2020 presentaron el 90% de los casos nuevos de leishmaniasis cutánea a nivel mundial.

Por lo anterior la Leishmaniasis es considerada una enfermedad de interés público, por lo cual se buscan mecanismos que permitan establecer criterios clínicos y de laboratorio para acceder a una identificación oportuna y que sea útil en todo el territorio nacional con el fin de mitigar reacciones adversas de la enfermedad; para esto una alternativa que se plantea es el uso de los aptámeros, los cuales son cadenas de ADN o ARN que tienen la capacidad de adaptarse a cualquier estructura tridimensional con una alta sensibilidad y especificidad por blancos tanto inmunógenos como no inmunógenos.

Los aptámeros son novedosos por su capacidad de conservación a largo plazo a temperatura ambiente, su alta pureza y su fácil obtención, ya que al ser in vitro no depende de células, por lo que se considera un proceso sencillo y reproducible con muy poca variedad entre sus producciones, además de permitir elegir las condiciones de selectividad para obtener aptámeros con las condiciones deseadas para el diagnóstico de la enfermedad.

Es por esto que el objetivo de la monografía es compilar información y demostrar que los aptámeros son una herramienta viable, eficaz y de mayor acceso en zonas tropicales de Colombia en donde sea de mayor prevalencia la enfermedad de Leishmaniasis y que con estos se puede garantizar resultados fiables y de manera oportuna.

PALABRAS CLAVE: Aptámeros , Enfermedad Zoonótica, Vector, Parásito , Reservorio Leishmaniasis Cutánea (LC) , Leishmaniasis Mucosa (LM), Leishmaniasis Visceral (LV) Leishmaniasis Cutánea Atípica (LCA) , Leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

Estudiantes: Karen Lorena Hurtado Ramirez, Heidy Tatiana Moreno Bautista

Asesor: Sandra Mónica Estupiñan Torres

Fecha: Septiembre 2022

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias son de distribución universal y son causantes de una significativa morbimortalidad, principalmente en las regiones tropicales del mundo. Estas enfermedades están asociadas a un bajo grado de desarrollo, malas condiciones sanitarias y de determinadas condiciones ecológicas. En los países desarrollados, las medidas de salud pública, el control vectorial y la educación sanitaria han permitido el control de la mayoría de las parasitosis, e incluso la erradicación de algunas de ellas.⁶

Sin embargo los recursos para el diagnóstico, el tratamiento, el seguimiento, la prevención y la investigación de estas enfermedades parasitarias son insuficientes, por esta razón hay un gran número de estas infecciones que se han denominado como enfermedades tropicales olvidadas o desatendidas. Adicionalmente, hasta el momento, no existe ninguna vacuna para su control y los antiparasitarios producen graves efectos secundarios, por lo que es importante la búsqueda de alternativas diagnósticas con alta sensibilidad y especificidad, de bajo costo y fácil acceso.⁶

Dentro de las enfermedades parasitarias tisulares se encuentra el chagas, la malaria y la leishmaniasis de las cuales esta última a nivel mundial, se encuentra entre las diez enfermedades tropicales desatendidas, afectando a más de 12 millones de personas, donde se presentan entre 0,9 y 1,6 millones de nuevos casos al año, alrededor de 20.000 a 30.000 defunciones y 350 millones de personas están en riesgo de infectarse.⁶

Actualmente en América se registra un promedio de 56.000 casos de leishmaniasis cutánea y mucosa y 3.800 casos de leishmaniasis visceral en el año, esta enfermedad causa una letalidad media de 7%. La leishmaniasis cutánea se registra en 20 países, siendo endémica en 18 de ellos (Colombia, Costa Rica, Brasil, Argentina, Ecuador, Venezuela, Bolivia, Perú, Paraguay, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Guyana, Surinam, Guatemala, Guyana Francesa y México) y la leishmaniasis visceral en 12 países (Brasil, Argentina, Paraguay, Colombia, Venezuela, Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Bolivia, Guyana y México). En la Región, 27% de los casos de leishmaniasis cutánea se presentan en zonas fronterizas.⁷

El diagnóstico de esta enfermedad se da en conjunto con criterios clínicos y epidemiológicos, se puede hacer por métodos directos como lo son el frotis, la biopsia, el cultivo y la PCR o por métodos indirectos como inmunofluorescencia indirecta, ELISA y prueba de Montenegro, las desventajas de estos métodos es que algunos son muy costosos, no tienen una buena sensibilidad y especificidad, se requiere de equipos avanzados, de personal experto, son invasivos y además tienen muchas variables como la evolución de la lesión, si el paciente se ha sometido a tratamientos previos o no, las técnicas empleadas para la recolección de la muestra, la ubicación geográfica entre otras, que pueden afectar el resultado.⁸

Por ello en la actualidad se buscan nuevas alternativas y es allí donde los aptámeros, descritos por primera vez en 1990, que son secuencias de ADN o ARN de cadena sencilla que adquieren la forma de estructuras tridimensionales únicas permitiéndoles reconocer con gran afinidad un blanco específico y que dentro de sus potenciales usos comprende, entre otros, el diagnóstico de enfermedades, el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, la detección de riesgos alimentarios, la producción de biosensores, la detección de toxinas, el transporte de fármacos en el organismo y la señalización de nanopartícula, lo que lo convierte en un potencial método diagnóstico.⁶

Además de poseer características que hacen de los aptámeros algo novedoso, como son su capacidad de conservación a largo plazo en temperatura ambiente, su alta pureza y su fácil obtención, ya que al ser *in vitro* no depende de células o animales por lo que se considera un proceso sencillo y reproducible con muy poca variedad entre sus producciones, además de permitir elegir las condiciones de selectividad para obtener aptámeros con las condiciones deseadas para el diagnóstico de la enfermedad.⁹

El presente trabajo tuvo como objetivo recopilar evidencia bibliográfica sobre los aptámeros como potencial herramienta para el diagnóstico de *Leishmania*.

1. Antecedentes

Iván Darío Velez , et al en el año 2001 realizaron un estudio para establecer el comportamiento de la *leishmania* en Colombia, allí determinaron que se presenta un

aproximado de 6.500 casos en personas civiles y otros 2.000 en miembros del ejército, los hombres son los que presentan mayor afectación en un rango de edad de 15 a 45 años.¹⁰

También se logró determinar que los casos van en aumento debido a que cada vez más el ser humano ingresa en el nicho ecológico propio de los vectores y reservorios de la leishmania, lo que conlleva a que estas zonas queden lejos de centros de salud por lo que su diagnóstico y tratamiento es más complejo de llevar a cabo.¹⁰

Por ello la búsqueda de un método de diagnóstico que sea de fácil manipulación, conservación, y obtención es importante para poder tratar el problema de salud pública causado durante años por la leishmaniasis.¹⁰

En el año 2012 Botero J y Frank J, hablaron en su investigación de los aptámeros desde el punto de vista etimológico el término aptámero proviene del latín aptus que significa ‘fijar’ o ‘unir’ y del griego meros que significa ‘partícula’. En el año de 1990 unos investigadores lograron identificar que para la generación de estas moléculas se necesitaba de un método llamado SELEX, este utiliza la química combinatoria, la cual consiste en la síntesis de un número significativo de moléculas de estructura similar que forman colecciones a las cuales se les llama bibliotecas, esto se hace para seleccionar ácidos nucleicos sintéticos con alta afinidad por su molécula diana. Este método consta de tres pasos: 1) la interacción entre los miembros de la biblioteca y la molécula diana; 2) la selección de los miembros que poseen afinidad por la molécula diana y 3) el enriquecimiento de la biblioteca mediante amplificación usando PCR. En los aptámeros la afinidad está ligada al número de ciclos de SELEX que se lleven a cabo y a la efectividad del proceso de separación de secuencias que se unen con alta o baja afinidad a la molécula diana.¹¹

Durante el 2016 Juan David Ramírez, et al realizaron una recopilación de datos correspondientes a un periodo de 21 años con el fin de determinar la especie con más incidencia en el territorio causante de la leishmaniasis cutánea el cual abarca un 96,35% de casos totales en el país.¹²

Se realizó por medio de muestreos intensivos por medio de biopsias obtenidas tanto en humanos como en animales domésticos y salvajes bajo protocolos y consentimientos

informados , lo que llevó a determinar que la especie de *Leishmania* con mayor frecuencia , diversidad genética y con más extensión por el territorio es la *L. panamensis* la cual representa un 61,3 % de la totalidad de los casos. ¹²

En el año 2018 Manotas H, et al. Realizaron un estudio sobre un brote de leishmaniasis visceral en niños de la zona urbana de Neiva en donde se describen las características epidemiológicas, clínicas y el tratamiento. Los vectores de la leishmaniasis corresponden al género *Lutzomyia*. Se demuestra su presencia desde el nivel del mar hasta los 3.500 metros sobre el nivel del mar (msnm), Los hábitos y la bionomía del vector son las determinantes de la dinámica de la transmisión. La leishmaniasis es una zoonosis de las zonas rurales tropicales, sin embargo las constantes intervenciones del hombre al nicho ecológico de los vectores, como hospederos y la adaptación de algunas especies a los nuevos hábitats, han condicionado un cambio en la incidencia de la patología. En Colombia se ha documentado el impacto de estos cambios con la presencia de casos aislados en zonas urbanas de Cartagena. En el presente trabajo se describe el primer brote de leishmaniasis urbana en Neiva, capital del departamento del Huila; localizada entre las Cordillera Central y Oriental; cruzada por los ríos Las Ceibas, del Oro y Magdalena. Se encuentra a 442 msnm y tiene una humedad relativa del 66%.¹³

El diagnóstico de la leishmaniasis ha sido un gran desafío, ya que sus características clínicas son similares a otras enfermedades comunes, como lo son la tuberculosis, la fiebre tifoidea y la malaria. Los métodos de laboratorio confiables se vuelven importantes para el diagnóstico diferencial. Se necesitan con urgencia métodos rápidos para el diagnóstico y la identificación de especies, junto con terapias, profilácticos y medidas de control que sean eficaces, seguros, asequibles y fáciles de administrar. ¹⁴

Una de las herramientas por las cuales se ha optado para garantizar un diagnóstico más efectivo de la leishmaniasis es el uso de aptámeros por eso Ospina JD en el año 2020 recopiló algunos estudios que se realizaron de los aptámeros en donde describe que estos son secuencias de ADN o ARN de cadena sencilla que adoptan la forma de estructuras tridimensionales únicas, lo cual les permite reconocer un blanco específico con gran afinidad. Sus usos potenciales abarcan, entre otros, el diagnóstico de enfermedades, el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, la detección de riesgos alimentarios, la producción de biosensores, la detección de toxinas, el transporte de fármacos en el organismo y la

señalización de nanopartículas. En parasitología, se destacan los estudios que se vienen realizando en *Leishmania* spp., con la obtención de aptámeros que reconocen la proteína de unión a poliA (LiPABP) y que pueden tener potencial utilidad en la investigación, el diagnóstico y el tratamiento de la leishmaniasis. Adicionalmente estos se pueden usar para en varios objetivos como novedosa herramienta terapéutica, como transportadores de fármacos, en la marcación para imágenes biológicas, como biosensores, en la inspección de alimentos y en la orientación de nanopartículas.¹⁵

En el año 2021 Sarah M. realizó una revisión sobre la leishmaniasis en el cual se buscó recopilar el conocimiento actual sobre la epidemiología, las manifestaciones clínicas, el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad parasitaria. A nivel mundial se han considerado las sales antimoniales como el tratamiento de primera línea. Sin embargo, en India se observó un aumento dramático en la falla terapéutica hasta del 65% de los casos; estos hallazgos también se han encontrado en otros estudios y han llevado al cambio de los esquemas de tratamiento. Esta es una enfermedad tropical desatendida que afecta a las poblaciones más pobres del mundo en más de 90 países de Asia, África, Oriente Medio y América Central y del Sur. Se han caracterizado más de 20 especies del parásito *Leishmania* y se transmiten a partir de aproximadamente 70 tipos diferentes de flebotomos los cuales se encuentran en todo el mundo y las especies tropicales pueden completar el ciclo de vida durante todo el año. En áreas subtropicales, las especies sólo pueden completar sus ciclos de vida durante los meses más cálidos. Los flebotomos, que son más activos durante la noche, vuelan en silencio.¹⁶

Como se ha mencionado anteriormente y como se destaca en este artículo del año 2022 la leishmaniasis es una enfermedad tropical transmitida por vectores que, dependiendo de la especie causal, produce 3 manifestaciones clínicas diferentes: leishmaniasis cutánea, mucosa y visceral. En Colombia, *Leishmania (viannia) panamensis* es responsable de hasta el 79% de los casos. El diagnóstico de leishmaniasis carece de un método estándar de oro y las pruebas más sensibles solo pueden realizarse en laboratorios con equipos especializados para realizar qPCR, ELISA e IIF. En consecuencia, las moléculas sintéticas como los aptámeros han mostrado el potencial de desempeñar un papel en el desarrollo de biosensores precisos para el diagnóstico y seguimiento de la leishmaniasis en áreas endémicas. En el estudio de Ospina J, et al, se utilizaron muestras de suero de pacientes infectados con leishmaniasis cutánea y de

mucosas para seleccionar aptámeros de ADN que reconocen una proteína previamente identificada que se denominó proteína D de *Leishmania panamensis* (LpD) como biomarcador de leishmaniasis de mucosas a través de Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX).¹⁷

Marco Teórico

Leishmaniosis

La Leishmaniosis es una zoonosis parasitaria en las que diferentes especies de animales actúan como reservorios de este parásito. Dentro de su ciclo de vida se incluyen unos mosquitos llamados flebótomos o también conocidos con el nombre de beatillas o moscas de los arenales. Este parásito se presenta bajo dos formas: amastigote (en hospedadores vertebrados) y promastigote (en mosquitos y medios de cultivo).¹⁸

A lo largo de los años se han detectado más de 20 especies de *Leishmania* las cuales son transmitidos más o menos por unos 60 tipos diferentes de flebótomos por lo cual la Leishmaniosis se ha dividido geográficamente en viejo mundo, haciendo referencia al hemisferio oriental y nuevo mundo, el cual hace referencia al hemisferio occidental.¹⁸

La hembra del mosquito flebótomo es la que transmite esta enfermedad a humanos y animales, esta se encuentra activa principalmente durante las horas de la noche. Este vector inyecta en la piel de su huésped el promastigote el cual es fagocitado por las células mononucleares y se convierte en la forma de amastigote los cuales se multiplican y se desarrollan dentro del sistema retículo endotelial del huésped en donde causan las formas sintomáticas y asintomáticas de la enfermedad (Figura 1)

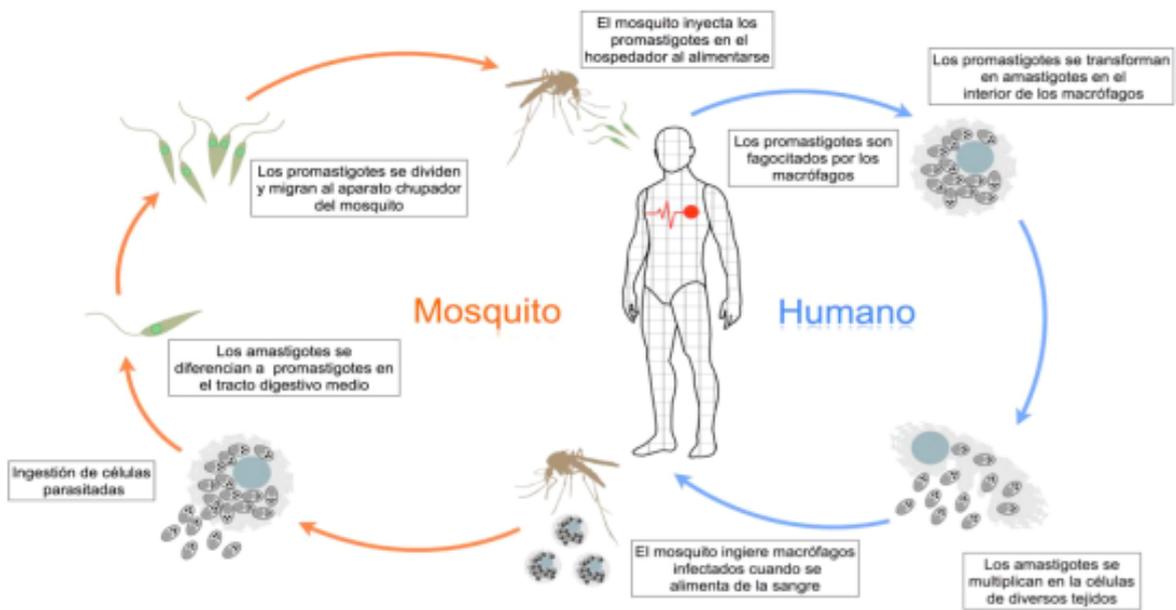


Figura 1. Ciclo de Vida *Leishmania* spp.¹⁹

En los humanos la infección por *Leishmania* puede presentarse en tres formas: La Leishmaniosis cutánea, mucosa y visceral, esto varía dependiendo la especie de *Leishmania* y la respuesta inmune del huésped y otros factores.²⁰

La leishmaniosis es una enfermedad tropical desatendida, tiene una frecuencia elevada en áreas rurales en donde afecta a las poblaciones más vulnerables debido a que esta enfermedad está asociada en la mayoría de los casos por la malnutrición, el desplazamiento poblacional, las inadecuadas condiciones de vivienda, la inmunodeficiencia, la falta de recursos, y en muchas ocasiones también está asociada a cambios ambientales como la deforestación, la urbanización y entre otros.²⁰

La OMS registró como es el comportamiento de *Leishmania* en las regiones a nivel mundial, encontrando que en la región de África la forma visceral, cutánea y mucocutánea de la enfermedad son endémicas por lo cual son habituales los brotes de LV, en cuanto a la región de las Américas se evidenció que la epidemiología de LC es muy compleja de determinar y esto debido a la gran variedad que se presenta en los ciclos de transmisión, la clase de reservorios, el comportamiento de los vectores, las manifestaciones clínicas y la respuesta al tratamiento que presentan los pacientes, en la región del Mediterráneo Oriental se concentra el 80% de los casos de LC del mundo, además la región de Europa presenta casos endémicos

de LC y LV que en su mayoría son importados de África y las Américas, por último en la región de Asia Sudoriental la LV es la principal forma en la que se presenta la enfermedad en importante anotar que esta es la única región que cuenta con una iniciativa para eliminar la LV como problema de salud pública.²¹

En Colombia, según el boletín del periodo epidemiológico 5 del 2022, hasta el momento van notificados 1691 casos de los cuales 1320 se presentan en hombres y 371 en mujeres, la población más afectada son los militares y el rango de edad donde se presenta mayor presencia de la enfermedad es entre los 15 y 45 años, siendo Antioquia el departamento con mayor incidencia de casos.²²

La leishmaniasis se presenta con tres manifestaciones clínicas la LC, LM y LV sin embargo varios autores han determinado que respecto a LC esta se puede presentar de distintas formas una de ella es la Leishmaniasis cutánea diseminada, Leishmaniasis cutánea difusa y Leishmaniasis cutánea atípica, estos inician con una mácula que es efecto de la picadura, allí comienza el proceso de incubación del parásito que va de 2 semanas a 2 meses, si la mácula aumenta de tamaño este se toma como el primer indicio de LC este va a evolucionar a nódulo el cual se caracteriza por ser redondeado e indoloro, y que va a aumentar progresivamente de tamaño hasta que se ulcera, esta lesión tiene como particularidades que es fondo limpio, color rosado, tejido granuloso, redondeada, de bordes regulares y elevados, indolora y de base indurada, si en algún momento esta lesión presenta dolor significa que está infectada con otro microorganismo (Figura 2).²³



Figura 2. Leishmaniasis Cutánea²⁴

Respecto a la Leishmaniasis cutánea diseminada esta es poco frecuente, sin embargo, tiene importancia debido a que en algunas zonas tiene gran incidencia, se han distinguido 5 clases de Leishmania causante de esta enfermedad como lo son *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) panamensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) mexicana*.²³

Su principal característica es la aparición de lesiones múltiples papulares que en los inicios de la enfermedad pueden aparecer con características clásicas como lesiones ulceradas, granulomatosas y de bordes elevados, luego de este proceso y a medida de la diseminación del parásito por el cuerpo pueden aparecer cientos de lesiones que ya van a cambiar de características y tienen apariencia de acné que se pueden dar en diferentes partes del cuerpo (Figura 3).²³



Figura 3.Leishmaniasis cutánea diseminada²⁵

Referente a la Leishmaniasis cutánea difusa (LCD) esta forma ha sido reportada en varios países de América Latina en los que se encuentra Colombia, esta forma de la leishmaniasis se distingue por ser grave y por ser la forma enérgica de la enfermedad ya que por efecto del parásito o de la respuesta inmune del paciente este le impide que responda de manera satisfactoria al tratamiento, suele confundirse con las lesiones de lepra lepromatosa ya que no solo afecta la superficie de la piel sino que con su evolución pasan a invadir el tegumento (Figura 4).²³



Figura 4. Leishmaniasis Cutánea Difusa ²⁶

En cuanto a la Leishmaniasis cutánea atípica (LCA) se manifiesta de forma de lesiones circunscritas y a diferencia de las demás esta no es ulcerada (Figura 5), es producida por *L. (L.) infantum* y se ha informado de su presencia en Centroamérica y Venezuela. ²³



An Pediatr (Barc). 2021;94:118-9

Figura 5. Leishmania Cutánea Atípica ²⁷

Otro tipo de manifestación es la leishmaniasis mucosa o mucocutánea, para que esta se presente se deben tener factores predisponentes como la genética la respuesta inmune del paciente y la especie que produce la infección, el parásito más frecuentemente es *L. (V.) braziliensis*, seguido de *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) guyanensis*.

Esta lesión se da por complicación de una metástasis por vía hematológica o linfática de una lesión cutánea distante, o por la picadura directa del vector en la mucosa, se puede presentar meses o años después de la forma cutánea por lo general se da en un rango de 2 años después de la aparición de la primera lesión , en algunos casos se puede dar de forma simultánea con LC ,el sitio comúnmente afectado es el tabique nasal donde se presenta sensación de obstrucción, prurito, dolor, costra o rinorrea , el eritema, edema o infiltración produce aumento del volumen de la punta de la nariz y las alas nasales y puede extenderse tanto hasta perforar el tabique nasal o incluso puede destruir todas las estructuras, por lo que causa una deformidad, afectando otras zonas como el paladar o laringe (Figura 6), por lo que en algunos casos se realiza amputación del área afectada .²³



Figura 6. Leishmaniasis Mucocutánea²⁸

Por último, la forma clínica más grave de la leishmaniasis es la visceral que tiene un periodo de incubación que va de 2 semanas a 2 meses y que principalmente afecta a niños menores de 5 años, se da por la invasión de parásitos y macrófagos infectados a órganos y tejidos hematopoyéticos.

El cuadro clínico se puede dar de forma leve, moderado o grave en un inicio se presenta fiebre la cual puede ser constante o intermitente además de observarse la presencia de esplenomegalia discreta que es un síntoma que presentan todos los pacientes, la hepatomegalia que puede o no estar presente, las linfadenopatías, palidez mucocutánea y pérdida de peso, que se da de forma lenta y progresiva.

El avance de la enfermedad se da con la persistencia de la fiebre y aparición de otros síntomas como caída del estado general, anorexia, palidez intensa de mucosas, aumento del volumen abdominal y hepatoesplenomegalia (Figura 7), este estado de inmunosupresión

avanzada conlleva a la presencia de leucopenia, hipoalbuminemia, trombocitopenia e hipergammaglobulinemia lo que puede agravar la enfermedad y causar la muerte.²³



Figura 7. Leishmaniasis Visceral ²⁹

Diagnóstico de leishmania cutánea y mucocutánea , para la obtención de la muestra esta se puede tomar por medio de un raspado o una biopsia de la lesión que sea más reciente.

En cuanto a técnicas se puede hacer un examen microscópico para la identificación de amastigotes esto se hace con tinción con Giemsa, estudio histopatológico de muestras fijadas, cultivo en medio NNN el cual se debe mantener al menos 4 semanas, ya que el crecimiento puede ser lento, identificación de la especie por medio de un aislamiento con anticuerpos monoclonales, análisis de isoenzimas, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) esta última útil para el diagnóstico en casos con baja carga parasitaria.³⁰

Es importante realizar un diagnóstico diferencial, las enfermedades con las que se puede confundir este tipo de lesión son con picadura de insecto, úlceras traumáticas, nódulos piogénicos, granuloma, infecciones por micobacterias, infecciones fúngicas, lepra, sarcoidosis, esporotricosis, sífilis, tumores cutáneos.

En cuanto a su tratamiento el fin de este es mejorar la cicatrización de las lesiones y prevenir la diseminación parasitaria o recaída, los antimoniales pentavalentes, parenterales, intralesionales, amfotericina B, pentamidina, miltefosina y termoterapia son los tratamientos que actualmente se ofrecen, sin embargo muchos de estos presentan efectos secundarios como dolor musculoesquelético, toxicidad hepática o cardíaca, náuseas, anorexia, mareo, prurito, hipotensión, necrosis en el lugar de punción, alteraciones hematológicas y

electrolíticas, hiperpirexia, malestar general, tromboflebitis, daño renal, hipopotasemia, anemia y hepatitis además de que su eficacia se ve reducida ya que en muchas ocasiones depende de la especie de leishmania para tener una respuesta satisfactoria al tratamiento.³¹

Respecto a la cirugía reconstructiva esta se emplea en los casos donde la nariz o cara están desfiguradas, y se realiza 12 meses después de que el paciente haya comenzado el tratamiento para evitar el rechazo de injerto de piel en caso de presentar una recaída.³²

En cuanto al diagnóstico de Leishmaniasis visceral este se determina principalmente por prueba rápida inmunocromatográfica, basada en antígeno recombinante rK39, junto con Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) o Ensayo Inmunoenzimático (ELISA), las pruebas parasitológicas se realizan con el fin de determinar la presencia de parásitos en tejidos infectados, principalmente la médula ósea de la cual se puede hacer un examen directo o aislamiento en cultivo (in vitro).³³

Los fármacos de elección para tratar esta enfermedad son Anfotericina B liposomal, antimoniales pentavalentes y anfotericina B desoxicolato, estos administrados bajo supervisión debido a los efectos secundarios y resistencia que estos presentan como disminución en la función renal, hepática, cardíaca, y la hipersensibilidad que pueden causar, no se recomienda el uso en menores de 1 año y en mayores de 50 ni en embarazadas o personas inmunosuprimidas.³⁴

3.4 Aptámeros

Los aptámeros son oligonucleótidos monocatenarios cortos que se unen a moléculas diana específicas, lo cual les proporciona una alta afinidad y una excelente especificidad hacia los objetivos en estudio, debido a esto los aptámeros pueden usarse como análogos de los anticuerpos. Los aptámeros se producen a través de un procedimiento de evolución molecular in vitro, el cual los aísla específicamente para el objetivo de interés e involucra rondas repetitivas de selección y amplificación, denominadas SELEX el cual significa evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial. Este puede ser empleado para compuestos pequeños, proteínas, nanopartículas y células vivas. Debido a lo anterior se puede considerar que la principal ventaja de este procedimiento es seleccionar aptámeros, como afinidad basada en ácidos nucleicos.³

A lo largo de los años, los aptámeros se han venido convirtiendo en una alternativa prometedora a los anticuerpos, ya que tienen mayor estabilidad térmica y química, adicionalmente su síntesis química simple reduce el costo de producción y también es posible realizar modificaciones a través del proceso de síntesis química para hacerlos más adaptables para diferentes aplicaciones.³⁶ Además, los aptámeros pueden bloquear la función de las proteínas diana y como resultado, pueden ser una buena opción para el desarrollo de nuevas terapias para las infecciones, se utilizan también para desarrollar nuevos fármacos, como agentes de diagnóstico y de bioimagen, analíticos, inspección de alimentos y detección de peligros ³⁶. Dentro de otras funciones de los aptámeros está incluida su capacidad para bloquear la interacción receptor-ligando o activar la función de los receptores diana, así como también pueden actuar como portadores de diana prometedoros para administrar agentes terapéuticos de forma selectiva a las células dianas. Pero también se debe tener en cuenta que los aptámeros cuentan con algunas desventajas como por ejemplo que son sensibles a la degradación enzimática por nucleasa en las células y la circulación sanguínea lo cual causa desafíos con respecto a la administración tópica o sistémica de este tipo de medicamentos, ya que debido al bajo peso molecular y el corto tiempo de permanencia de los aptámeros en la circulación se generan algunos inconvenientes con respecto al control de la filtración renal.³⁷

Estructura y propiedades de los aptámeros

En la figura 8 se observa como un aptámero posee una estructura tridimensional específica, lo cual les permite unirse con mayor afinidad y especificidad a la molécula diana de interés, adicionalmente son más flexibles, por lo que pueden unirse a epítomos interiores los cuales no son accesibles por los anticuerpos y tienen más estabilidad, ya que después de someterlos a desnaturalización pueden volver a su conformación primaria sin pérdida de la actividad ³⁸. Los aptámeros presentan diversas ventajas debido a sus propiedades químicas y biológicas dentro de las cuales están: su potencial obtención frente a proteínas no inmunogénicas, su capacidad de regeneración, su estabilidad a temperatura ambiente, las posibilidades de modificación de su estructura, bajos costos de producción debido a que se pueden obtener mediante síntesis química, evitando el uso de animales o células, su alta reproducibilidad y su capacidad para ser marcados.³⁸

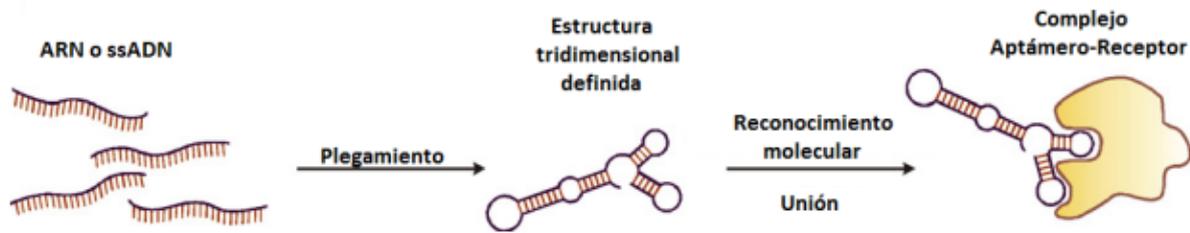


Figura 8. Representación esquemática del funcionamiento de los aptámeros ³⁹

Aplicación de los aptámeros

Los aptámeros se han aplicado en diversos campos de la vida como por ejemplo el desarrollo de nuevos fármacos, agentes de diagnóstico, reactivos analíticos, inspección de alimentos y detección de peligros, entre otros. Estas aplicaciones se dan gracias a sus funcionalidades como lo son: su capacidad para bloquear la interacción receptor-ligando o activar la función de los receptores, también pueden actuar como portadores de diana para administrar agentes terapéuticos de forma selectiva a las células diana ⁴⁰.

Algunas de las aplicaciones son las siguientes:

- **Aptámeros de ADN bacteriano**

Existen cepas de bacterias multirresistentes (MDR) como por ejemplo algunas cepas de *Salmonella*, las cuales se han desarrollado debido al uso inadecuado de antibióticos. Como consecuencia, se requieren nuevos agentes antimicrobianos para combatir estas cepas resistentes. En estudios se ha reportado que la incubación de 30 minutos de aptámero específico con cepas de *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, inhibe significativamente el crecimiento, el efecto antimicrobiano de este aptámero podría ser el resultado de la despolarización de la pared celular bacteriana. ⁴¹

- **Aptámeros como agentes terapéuticos**

En cuanto a la aplicación de aptámeros como agentes terapéuticos, estos han tenido un gran auge, debido a sus dos formas de uso: la primera es como moléculas efectoras para reconocer un receptor y ejercer la función terapéutica y otra es ser usados como

vehículos para la entrega de una molécula secundaria, que es la que tiene la propiedad terapéutica, existen aptámeros ya en fase clínica o aprobados para diferentes enfermedades como se observa en la Tabla 1.⁴²

Aptámero	Molécula diana	Uso/Indicación	Fase clínica	Ref.
Pegaptanib –sódico (Macugen®)	VEGF ₁₆₅	Degeneración macular asociada a la edad (DMAE)	Aprobado	[46]
		Retinopatía diabética	Fase III	[47]
		Oclusión de la vena retiniana	Fase II	[48]
ARC1779 (Archemix)	Factor von Willebrand	Microangiopatía trombótica	Fase II	[49]
E10030 (Ophthotech)	PDGF-B	DMAE	Fase II	NCT01-089517
AS1411 -AGRO001 (Antisoma – Archemix)	Nucleolin	Leucemia mieloide aguda	Fase II	[50]
REG-1 – RB006/RB007 (Regado Bioscience)	Factor IXa	Intervención coronaria percutánea	Fase II	[51]
NU172 (ARCA Biopharma)	Trombina	Cirugía de derivación de las arterias coronarias	Fase II	[52]
ARC1905 (Ophthotech)	C5	DMAE	Fase I	[53]
NOX-A12 (NOXXON Pharma)	SDF-1α	Linfoma	Fase I	[54]
NOX-E36 (NOXXON Pharma)	CCL2	Diabetes tipo 2 y nefropatía diabética	Fase I	[54]

Tabla 1. Aptámeros aprobados para enfermedades⁴¹

- **Aplicaciones terapéuticas basadas en aptámeros para la inhibición de la formación de biopelículas**

Existen infecciones crónicas causadas por cepas formadoras de biopelículas, las cuales son comunidades de microbios que se ubican en la matriz de exopolisacáridos las cuales pueden adherirse a las superficies, estas están asociadas con la acumulación de bacterias que tienen un perfil de resistencia a los antibióticos mucho más complejo, debido a la falla de los antibióticos en penetrar la capa de polisacáridos⁴³. El tratamiento de las infecciones por biopelículas es actualmente un problema grave y la terapia con antibióticos por sí sola suele ser inadecuada. Por lo cual se ha venido estudiando la interacción de las biopelículas con los aptámeros. Se ha demostrado

que, en presencia de los aptámeros, las células son atacadas más fácilmente por los antibióticos, en *Salmonella* el resultado de la interacción resulta en la restricción de la frecuencia de rotación bacteriana, debido a que el incremento de la repulsión electrostática de las células, impide la formación de biopelículas maduras como se representa en la figura 9. Por esta razón, se podría concluir que el uso de pretratamiento con aptámero podría eliminar la necesidad de antibióticos altamente potentes en dosis altas ⁴².

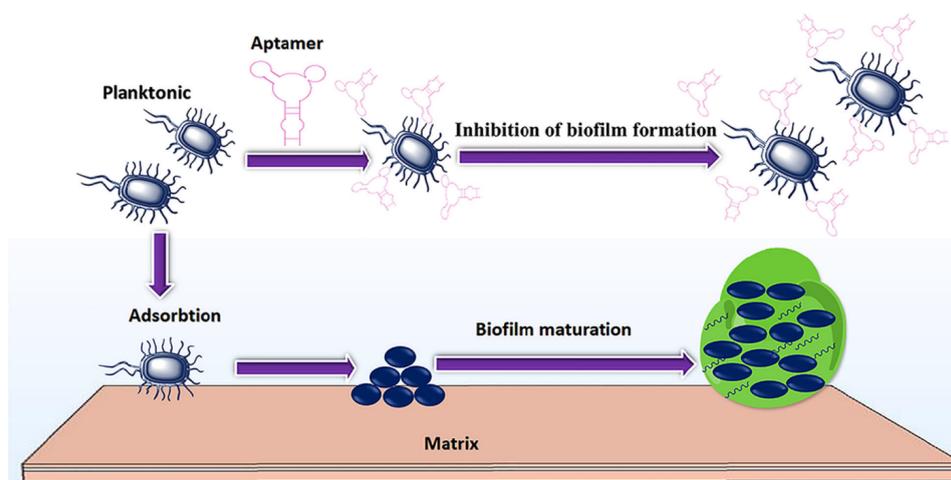


Figura 9. Efecto del aptámero como agente anti-biopelícula ⁴⁴

- **Aptámeros para la inhibición de toxinas microbianas**

Las toxinas son moléculas bioactivas muy poderosas las cuales le confieren a las bacterias patógenas un factor de virulencia esencial para causar daño en el organismo del huésped por medio de distintas vías fisiopatológicas, además muchas toxinas pueden atacar neutrófilos y macrófagos lo que provoca reducción en las respuestas inmunitarios lo que a su vez genera un ambiente propicio para la proliferación bacteriana causando persistencia de la infección alterando la estructura de las células cuando las toxinas degradan las vías de señalización.⁴⁴

En la Figura 10, se puede evidenciar en la parte A que cuando no hay presencia de aptámeros, después de la unión se forma un poro poro donde el heptámero de la toxina se inserta en la célula objetivo y conduce a la lisis celular. Cuando hay

presencia de aptámero, después de la unión, no se produce la formación de poros por eso se inhibe la lisis celular. En la parte B está la presencia de célula presentadora de antígenos (APC) y la enterotoxina estafilocócica (SE). SE unido a MHC clase II y TCR se expresa en células T CD4+. Las interacciones de MHC de clase II, SE y TCR pueden dar como resultado una hiperactivación de las células T, lo que lleva a una proliferación de estas últimas y al estallido incontrolado de numerosas citocinas y quimiocinas proinflamatorias. Lo que hace el aptámero es inhibir la activación de las células T, por lo que no se produce la producción de citocinas. En la parte C está el antígeno protector (PA), el cual se une al receptor de toxina del ántrax que luego interactúa con el Factor letal (LF) para formar la toxina letal. La translocación de LF a través del canal del heptámero PA hacia el citosol de la célula huésped da como resultado la muerte celular. Los aptámeros bloquean el sitio activo de LF y conducen a la supervivencia celular. Por último en la parte D se encuentra el BONT, botulínico, el cual se internaliza en los endosomas. En el citosol, la proteólisis por la cadena ligera escinde las proteínas SNARE (sinaptobrevina, SNAP25 y syntaxina) en las neuronas y previene la liberación de acetilcolina.⁴⁴

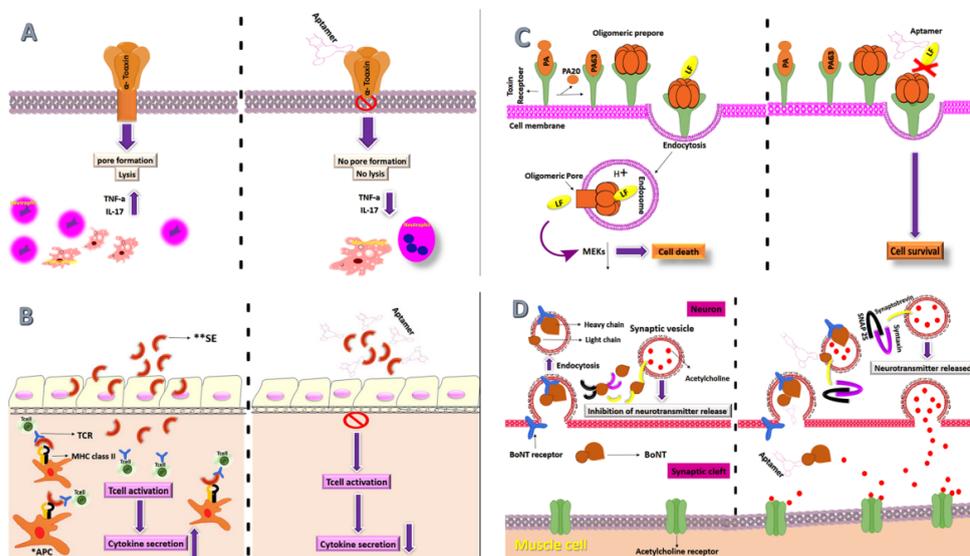


Figura 10. Función de los aptámeros frente a toxinas bacterianas ⁴⁴

- **Aptámeros como vehículos de suministro intracelular**

Los aptámeros pueden unirse específicamente a las moléculas receptoras de la superficie celular. Por lo tanto, los sistemas de administración basados en aptámeros

pueden mejorar la entrada celular de los agentes terapéuticos. Los aptámeros se pueden diseñar para una amplia gama de aplicaciones las cuales se pueden evidenciar en la Figura 11 en donde mediante la unión con acoplamiento de nanopartículas, fármacos u otros ácidos nucleicos logran desempeñar un papel importante en la internalización celular.⁴⁴

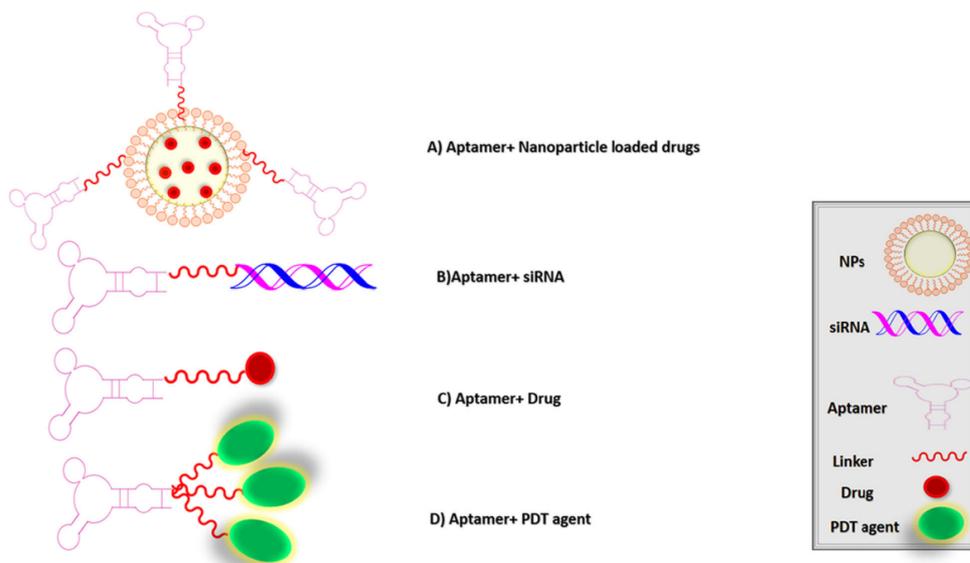


Figura 11. Aplicaciones terapéuticas de los aptámeros ⁴⁴

- **Aplicación de Aptámeros en el tratamiento de infecciones virales**

A causa de las mutaciones constantes que sufren los virus, muchos medicamentos virales son ineficaces. Además, muchos medicamentos antivirales pueden causar efectos secundarios graves o pueden interferir con otros fármacos y provocar una baja eficacia.⁴² Una alternativa como tratamiento dirigido, los aptámeros se pueden aplicar contra una variedad de virus. Pueden ser efectivos en la terapia antiviral a través de varios métodos, ya que pueden llegar a suprimir la replicación del ácido nucleico al inhibir el ensamblaje de la nucleocápside que reduce el ADN extracelular.⁴⁴ Con la elaboración de varios estudios a través del método SELEX .se ha podido desarrollar el tratamiento para varias infecciones virales como se puede evidenciar en la siguiente tabla:

Organismo	Tipo de aptámero	Objetivo	Efecto terapéutico aptámero
VHB	ADN	Proteína central	- Impedir el ensamblaje de la nucleocápside - funcionan suprimiendo la replicación del VHB
VHC	ADN	Proteína envoltante	- Inhibición de la unión del virus a las células huésped
gripe A virus	ADN	Proteína hemaglutinina	- Bloqueo de la unión del virus a los receptores de las células diana - prevención de la invasión del virus en las células huésped
virus del ébola	ARN	VP35	- Interrumpir la interacción eVP35- NP
VIH-1	ARN	proteína mordaza	- Inhibir la replicación del VIH-1
VHS-1	ARN	proteína gD	- Bloqueo de las funciones gD
virus vaccinia	ADN	Proteína hemaglutinina	- Reconocer proteínas expresado en la superficie de células infectadas por VV
gripe B Virus	ARN	Proteína hemaglutinina	- Fusión de membrana mediada por HA inhibida
SCV	ARN	nsP10	- Inhibe la actividad de desenrollado del ADN de doble cadena de la helicasa
virus de la rabia	ADN	Bloqueando la interacción entre el virus de la rabia y los receptores permisivos de la célula huésped	- Reducción de la replicación viral en un modelo de infección in vitro

VP35proteína viral 35,notario públiconucleoproteína,nsP10NTPasa/Helicasa

Tabla 2. Aptámeros para el tratamiento de infecciones virales ⁴⁴

- **Aplicación de aptámeros en el tratamiento de infecciones parasitarias**

Existen varias estrategias para el desarrollo de aptámeros específicos de parásitos, los cuales pueden prevenir la interacción entre el parásito y el huésped. Como por ejemplo en un estudio de Ulrich et al, se identificó un aptámero que podría bloquear las interacciones receptor-ligando entre *Trypanosoma cruzi* y células huésped epiteliales del riñón de mono LLC-MK2 y, por lo tanto, inhiben la invasión celular. ⁴² Los aptámeros pueden inhibir la función de las proteínas, la proteína de membrana eritrocítica 1 (EMP1) es un factor clave en la patogenicidad de la *Plasmodium falciparum*, esta proteína participa en la adhesión del parásito a los eritrocitos. Los aptámeros de ARN específicos pueden detectar esta proteína en la superficie de los eritrocitos infectados. Así que los aptámeros actúan como un fármaco anti-rosetas. ⁴⁴

Principios de las tecnologías de detección basada en aptámeros

El diagnóstico de enfermedades transmisibles se realiza a través de pruebas de laboratorio, exploraciones por imágenes o biopsias, las cuales son el primer paso para controlar las enfermedades transmisibles. ⁴⁵ Las pruebas de laboratorio, incluidos los métodos

microbiológicos, los métodos inmunológicos y la PCR, están ampliamente disponibles, se usan diariamente y son confiables, pero a su vez presentan varias desventajas, por lo que se le ha apostado a los métodos de diagnóstico alternativos que incluyen tecnologías de diagnóstico basadas en aptámeros. Los aptámeros también se denominan "anticuerpos químicos" y ofrecen ventajas únicas en comparación con los anticuerpos.³⁰

Existen varias tecnologías basadas en aptámeros para la detección de microorganismos, dentro de las cuales se encuentran las siguientes:

- **Ensayo de oligonucleótidos ligados a enzimas (ELONA)**

Esta tecnología, en lugar de utilizar anticuerpos como en la técnica ELISA usa los aptámeros como el principal elemento de reconocimiento molecular lo cual le confiere ciertas ventajas, como por ejemplo que los aptámeros se marcan fácilmente con biotina o colorantes de moléculas pequeñas que no afectan significativamente la especificidad y la afinidad de unión por las moléculas diana.⁴⁵

Al igual que la ELISA hay varios tipos de ELONA los cuales están representados en la Figura 12, en donde en la parte A se puede observar la ELONA Directa, en donde se evidencia que las muestras se recubren en la parte inferior del pocillo y se detectan utilizando el aptámero de detección de analito marcado con biotina. Cabe aclarar que entre más fuerte sea la señal esto indica que hay más analitos. En la parte B se representa la ELONA Sándwich en el cual se utiliza un aptámero dirigido al analito el cual se inmoviliza en el fondo y las muestras se agregan a los pocillos. Después los aptámeros inmovilizados capturan los analitos y los detectan utilizando otro aptámero dirigido a analitos. Y por último en la parte C tenemos la ELONA Competitiva en donde los aptámeros dirigidos al analito se inmovilizan en el fondo de la placa de los pocillos. Luego se añaden las muestras y un estándar conjugado conocido a los pocillos de forma sincrónica para permitir que los analitos compitan con la sustancia estándar. La señal más débil indica más analitos⁴⁵.

Hay que tener en cuenta que para estos dos últimos se debe inmovilizar el aptámero primario en la superficie del soporte sólido lo cual se puede llevar a cabo mediante reacciones físicas y químicas.

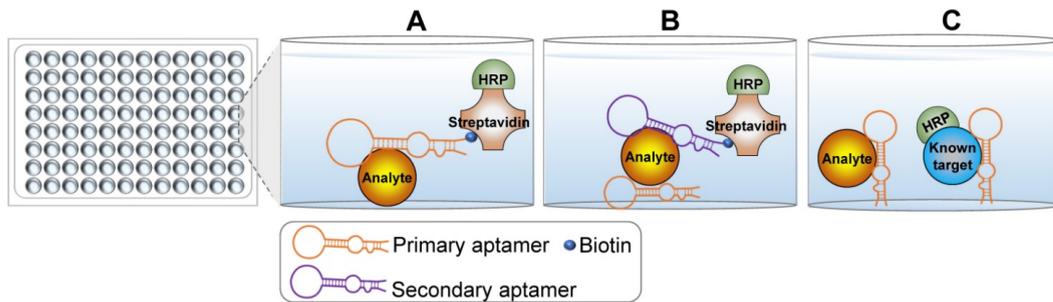


Figura 12. Principios ELONA ⁴⁵

- **Ensayo de flujo lateral basado en aptámeros (ALFA)**

Este es utilizado para detectar objetivos en muestras líquidas, se compone de cinco partes, primero está una almohadilla para cargar la muestra; luego una almohadilla que contiene el conjugado de moléculas de reconocimiento específicas del objetivo con partículas coloreadas o fluorescentes (CP); después hay una membrana que inmoviliza el sensor que reconoce objetivos en la línea de prueba y moléculas que capturan el conjugado de la almohadilla de conjugado en la línea de control; una almohadilla absorbente para absorber el flujo de líquido de muestra a través de la almohadilla de conjugado y la membrana; y una almohadilla de respaldo de apoyo para el sistema, así como se evidencia en la Figura 13. Esta tecnología tiene dos formatos: el ensayo directo en el cual las muestras se infiltran en la almohadilla de conjugado donde los objetivos se unen a las moléculas de reconocimiento conjugadas con CP. Los CP se detienen en la línea de prueba Las CP restantes son capturadas y retenidas por las moléculas de unión de CP inmovilizadas. Como resultado, tanto la línea de prueba como la de control se colorean. Sin embargo, si la muestra carece del objetivo, solo se colorea la línea de control. Y el ensayo competitivo tiene el mismo principio que el de los ensayos directos, pero la interpretación de los resultados es inversa, lo que quiere decir que un resultado de línea de dos colores indica negatividad y una línea de solo control indica positividad.⁴⁵

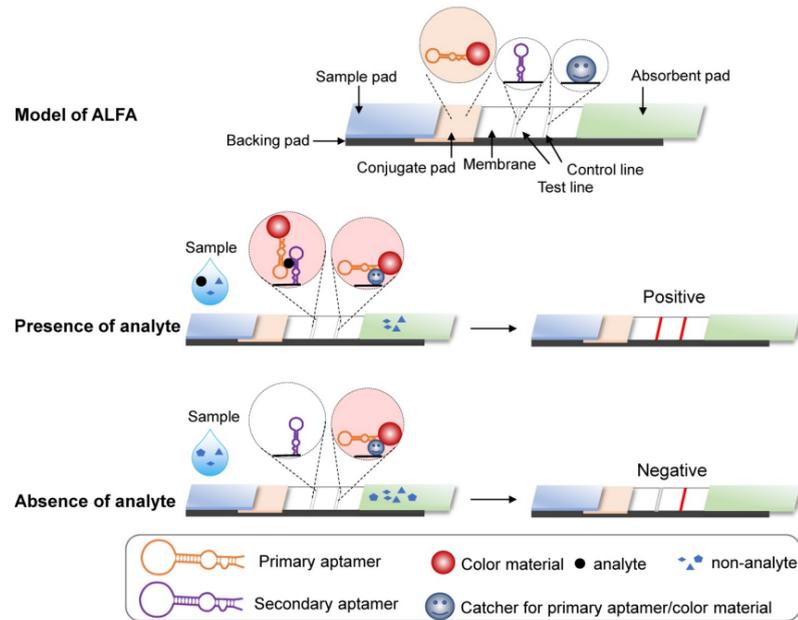


Figura 13. Representación esquemática de ALFA ⁴⁵

- **Aptasensor**

Los biosensores son sistemas de detección de analitos biológicos, en la Figura 14 se representa gráficamente que esta tecnología contiene un elemento sensor de bioreconocimiento, un transductor de señales y una unidad de procesamiento de señales.⁴³ Este elemento puede ser anticuerpos inmovilizados, aptámeros de ácidos nucleicos o proteínas, enzimas o incluso células. Los biosensores que utilizan aptámeros como elementos de reconocimiento se denominan aptasensores. Estos aptasensores se clasifican además como transductores de señal ópticos, electroquímicos o sensibles a la masa ⁴⁶.

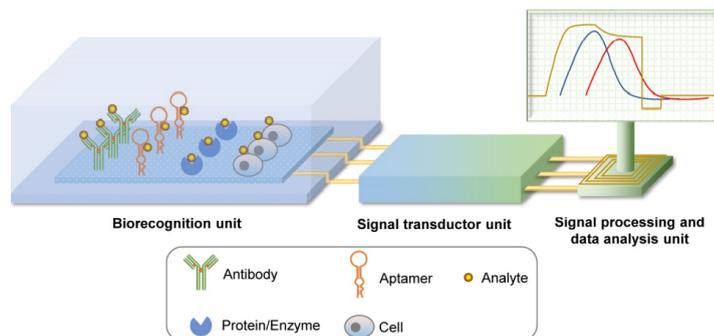


Figura 14. Biosensores con Aptámeros ⁴⁵

Los aptasensores ópticos generalmente se dividen en modelos de aptámeros marcados y sin marcar según la modificación del aptámero. En el modelo de aptámero marcado, los aptámeros se marcan con moléculas ópticamente activas, como tintes fluorescentes o materiales colorimétricos o luminiscentes. En un modelo de aptámero no marcado, el bioreconocimiento induce un cambio en las propiedades de la superficie que es detectado por un sistema óptico. ⁴⁵

- **Fluorofotometría basada en aptámeros**

Los aptámeros marcados con fluoróforo se pueden usar como sondas para detectar objetivos de interés mediante un citómetro de flujo, microscopía fluorescente o un fluorómetro. Un protocolo clásico para la detección de células cancerosas consiste en marcar las células cancerosas utilizando aptámeros marcados con fluoróforos específicos obtenidos mediante cell-SELEX. ⁴⁵

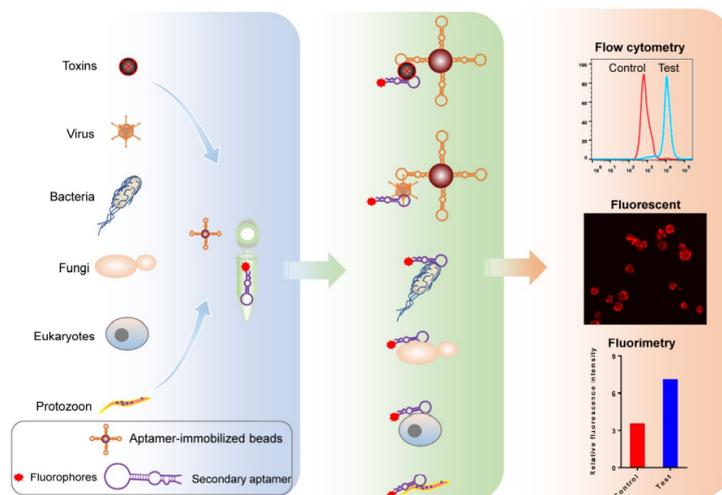


Figura 15. Sondas aptámeras marcadas con fluoróforo ⁴⁵

La figura 15 ilustra cómo este método es usado principalmente para detectar biomoléculas y microorganismos como virus, clamidia y micoplasma, que no se pueden aislar mediante técnicas de centrifugación ordinarias, perlas magnéticas inmovilizadas con aptámero o perlas de agarosa. Los aptámeros conjugados o marcados con fluoróforo se pueden usar como sondas para detectar patógenos y

toxinas microbianas mediante varios métodos, que incluyen citometría de flujo, microscopía fluorescente y fluorimetría. La intensidad de la señal fluorescente resultante refleja la cantidad de objetivo presente. Aunque los ensayos de sonda fluorescente basados en aptámeros son de bajo costo, simples, rápidos e intuitivos, tienen desventajas dentro de las cuales están la inmovilización de aptámeros, la dependencia de la precisión de los aparatos experimentales, un requisito para la configuración de control lógico y baja sensibilidad.⁴⁵

- **Ensayo de amplificación basado en la captura de patógenos mediada por aptámeros**

Enfoque viable para detectar analitos raros es la inmunocaptura o el atrapamiento de aptámeros, en los que se utilizan anticuerpos o aptámeros inmovilizados para un paso de enriquecimiento inicial. Para detectar proteínas y otras moléculas pequeñas, se puede utilizar la captura de aptámeros para la captura de objetivos. La captura de patógenos mediada por aptámeros se combina frecuentemente con PCR u otras tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos para aumentar la sensibilidad de detección. Debido a que los aptámeros de ácidos nucleicos pueden amplificarse mediante PCR, se pueden considerar para la detección dos estrategias de amplificación por PCR que utilizan ácidos nucleicos del analito o aptámeros como moldes de PCR.⁴⁵

- **Aptámeros aplicados para la detección de patógenos**

Así como se ha mencionado que los aptámeros tienen varias aplicaciones estos también son dirigidos a varios tipos de agentes patógenos como las bacterias, virus, hongos y parásitos, y para cada uno de estos han realizados estudios que ya han determinado algunos aptámeros para su detección.

- ❖ **Virus**

Los virus son parásitos intracelulares obligados con un diámetro de 20 a 300 nm. Generalmente, las partículas virales (viriones) consisten en un genoma de ADN o ARN y una cubierta proteica protectora del genoma conocida como

cápside ⁴⁷. A pesar de su estructura simple, los virus pueden causar una variedad de enfermedades en animales y plantas. Debido a lo anterior la Organización Mundial de la Salud (OMS) informa que más de 15 enfermedades endémicas o epidémicas, incluida la actual pandemia de COVID-19, son causadas por virus. Por eso es importante hacer una detección temprana ya que es una etapa crucial de la intervención de respuesta a epidemias y permite la implementación rápida de medidas de contención para reducir el riesgo de amplificación y posible propagación. Para lograr este objetivo se ha optado por utilizar tecnología basada en aptámeros para la detección de las partículas virales ⁴⁸. En la tabla 3 se evidencia algunos de los aptámeros de ácidos nucleicos dirigidos hacia algunas especies de virus. Cabe resaltar que la mayoría de estos aptámeros se seleccionaron usando proteínas de superficie viral como objetivos.

Virus	objetivo de aptámero	Kd	Método de detección	Límite de detección	Referencia
Parvovirus del pato	virus entero	467 nm	Ensayo colorimétrico basado en AuNP Chip	^{1,2} identificación electroquímica	[55]
virus del ébola	Proteína GP	4,1 nm	de detección controlado por magnetismo	4,2 ng/mL	[56]
Virus de la fiebre aftosa	VP1 estructural polipéptido	-	FRET competitivo	25 ng/mL	[57]
virus de la hepatitis B	antígeno E	0,4 nm	ELONA	0,1 ng/mL	[58]
virus de la hepatitis c	Antígeno central	100 nm	ESPARTO	10 pg/mL	[59]
VIH-1	La transcriptasa inversa	0,71 nm	Ensayo de radiactividad basado en aptámeros PCR de captura	100 viriones	[60]
Virus de la gripe H1N1	virus completo	55,14 nm	de aptámeros o sonda de fluorescencia	6,4×10 ⁻³ HAU o 0,032 HAU	[61, 62]
Virus de la gripe H5N1	Proteínas HA1	15,3 nm	Aptasensor electroquímico o aptasensor de dispersión Raman mejorado en superficie	100 FM o 10 ⁴ HAU	[63, 64]
SARS-CoV	proteína N	1,65 nm	Chip de aptámero de nanomatriz o sonda de aptámero fluorescente	2 pg/ml o 0,1 pg/mL	[65, 66]
SARS-CoV-2	RBD	6,05 nm	Aptámero-qPCR amplificación de señal	20:00	[67]
Fiebre Intensa con síndrome de trombocitopenia	Virus de la proteína de la nucleocápside	0,8 μM	ELONA	9 pg/mL	[68]
virus zika	proteína NS1	45 p.m. /134	ELONA	100 ng/mL	[69]
virus de la enfermedad de newcastle	virus entero	31 nm /78,1	ELONA	^{1,2} identificación electroquímica	[70]

Tabla 3. Aptámeros representativos para la detección de virus ⁴⁵

❖ Bacterias

Las bacterias son organismos microscópicos unicelulares que existen en millones de entornos, tanto dentro como fuera de otros organismos ⁴⁹. Debido a su significativo tamaño, las bacterias se pueden recolectar usando una centrífuga y la mayoría de los aptámeros contra bacterias se pueden seleccionar con SELEX basado en células enteras ⁴⁵. En la tabla 4 se encuentra información de algunos de los aptámeros que se han estudiado para la detección de bacterias.

Virus	objetivo de aptámero	Kd	Método de detección	Límite de detección	Referencia
<i>B. bifido</i>	Célula entera	10,69 nm	bioensayo colorimétrico	10000 UFC/mL	[121]
<i>C. jejuni</i>	Célula entera	292,8 nm	Aptasensor colorimétrico	100 UFC/mL	[122]
<i>E.coli 8739</i>	Proteínas de la membrana externa	1,65 nm	Competitivo FRET	30/ml	[123]
<i>E. coli O157:H7</i>	Célula entera	10,2 nm	aptasensor QCM	1460 UFC/mL	[124]
<i>L. monocytogenes</i>	Célula entera	74,4 o 48,74 nM	PCR de captura de anticuerpos o sonda de fluorescencia	5 o 75 UFC/mL	[125, 126]
<i>Tuberculosis M.</i>	Antígeno Ag85A/HspX	63 nM o 90 nM	Sonda de fluorescencia o ENOLA	1,5 nM o 10 pg	[127-130]
<i>N. meningitidis</i>	Célula entera	28,3 nm	Citometría de flujo	100 UFC/mL	[131]
<i>P. mirabilis</i>	Célula entera	4,1 nm	Aptasensor fluorescente	526 UFC/mL	[132]
<i>P. aeruginosa</i>	Célula entera	17,27 nm	Sonda de aptámero fluorométrico Aptasensor	1 UFC/mL	[133]
<i>S. enterica</i>	Vi-antígeno	638,6 nm	electroquímico Aptasensor de impedancia	100 pg/mL	[134]
<i>S. typhimurium</i>	Célula entera	58,5 nm	electroquímica Ensayo colorimétrico basado en	80 UFC/mL	[135]
<i>S. enteritidis</i>	Célula entera	309 nm	aptámeros Aptasensor impedimétrico	1000 UFC/mL	[136]
<i>S. dysenteriae</i>	Célula entera	23,47 nm		1 UFC/mL	[137]
<i>S. aureus</i>	Célula entera	1,39 µM	Aptasensor electroquímico	1 UFC/mL	[138, 139]
<i>V. fischeri</i>	Célula entera	128 pM/1,25 nM	ALFA	40 UFC/mL	[140]
<i>V. parahemolyticus</i>	Célula entera	16,88 nm	Captura basada en aptámeros/aptasensor colorimétrico PCR	10 UFC/mL	[51, 141, 142]
<i>V. vulnificus</i>	Célula entera	26,8 nm	de captura de aptámeros	8 UFC/mL	[143]

Tabla 4. Aptámeros representativos para la detección de bacterias ⁴⁵

❖ Hongos

Para detectar enfermedades fúngicas, los aptámeros se han utilizado en contra de las micotoxinas lo cuales son metabolitos secundarios tóxicos producidos por los hongos. Sobre la base de estos aptámeros, se han desarrollado muchos aptasensores para la detección de varias micotoxinas. También se han desarrollado aptámeros de nucleótidos dirigidos a hongos infecciosos. ⁴⁵

❖ Parásitos

-Plasmodium: Varios aptámeros dirigidos contra este parásito se han desarrollado y algunos se han utilizado para el diagnóstico. Para seleccionar un objetivo de aptámero para *P. falciparum*, Singh et al. realizó un estudio en donde inmovilizado *P. falciparum* glutamato deshidrogenasa (PfGDH, para SELEX) o glutamato deshidrogenasa humana (hGDH, para contra SELEX) en membranas de PVDF para proteína-SELEX. Se obtuvo un aptámero de ADN con una afinidad para detectar PfGDH en muestras de suero. En el estudio acoplaron este aptámero con puntos de carbono como sonda, también acoplaron el aptámero con un tinte como receptor para una reacción catalizada por enzimas, y aplicaron este aptámero como la captura en un biosensor de transistor de efecto de campo. ⁴⁴

-Leishmania: Se aislaron 2 aptámeros de los cuales uno de ellos se marcó con digoxigenina. Esta se unió a H3 y usó un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con HRP para la detección.⁴⁵

- **Potencial de la tecnología de aptámeros en la terapéutica de enfermedades transmisibles**

Las enzimas patógenas críticas y las proteínas funcionales se pueden utilizar como objetivos para el desarrollo de aptámeros para controlar la propagación de patógenos. Los aptámeros pueden actuar como ligandos activadores de enzimas y vías de señalización celular. Estos activadores inmunitarios y enzimas anti infecciosas pueden utilizarse como objetivos para el desarrollo de aptámeros para mejorar las respuestas inmunitarias del huésped contra la infección. Para los aptámeros funcionales, los objetivos ideales son dominios funcionales de proteínas. Los aptámeros no funcionales se pueden aplicar como vehículo de administración de fármacos para la terapia dirigida en el control de enfermedades infecciosas. Estos aptámeros pueden ser aplicados directamente o combinado con varias nanopartículas para administrar siRNA o medicamentos anti infecciosos a las células u órganos infectados.⁴⁵

- **Control de Patógenos**

Se pueden aplicar tres tipos de tecnología mediante el uso de aptámeros para el control de la propagación de patógenos: En primer lugar los aptámeros que se dirigen a las proteínas de la superficie viral o del huésped que median la entrada en la célula huésped; Por otro lado los aptámeros que se dirigen o bloquean las proteínas patógenas necesarias para la propagación; Y finalmente los aptámeros dirigidos a toxinas secretadas por patógenos ⁴⁵; estas tecnologías se pueden evidenciar gráficamente en la Figura 16.

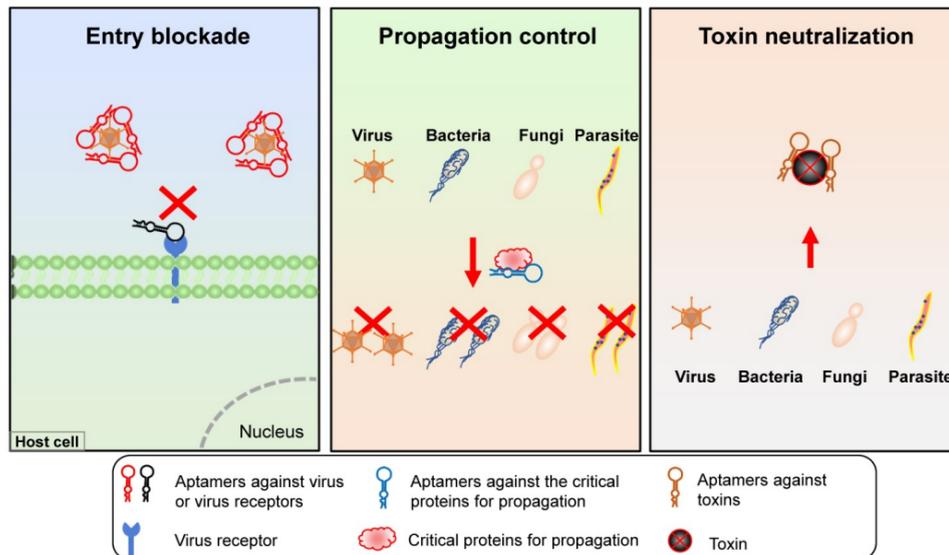


Figura 16. aplicaciones de aptámeros en el control de infecciones por patógenos ⁴⁵

- **Terapia dirigida**

Debido a que los aptámeros se unen específicamente a sus objetivos, se pueden aplicar como vehículos para agentes anticancerígenos o anti patógenos para dirigir fármacos a lugares específicos ⁵⁰.

La administración de objetivos basada en aptámeros se ha aplicado para controlar enfermedades bacterianas y parasitarias. Como por ejemplo en un estudio un aptámero de ADN dirigido *S. aureus* fue utilizado como puerta de guía y liberación de fármacos de una nanocápsula cargada con vancomicina o la nanopartícula de ácido poliláctico-co-glicólico encapsulada con teicoplanina para inhibir la propagación de *S. aureus* ⁴⁵.

Algo que cabe resaltar es que, debido a que los aptámeros dirigidos a patógenos se pueden obtener fácilmente, la administración de agentes anti patógenos guiada por aptámeros es una terapia prometedora para enfermedades infecciosas que es eficiente, específica y conlleva un bajo riesgo de infección de amplio espectro. resistencia a las drogas ⁴⁵.

- **Mejora del Sistema Inmunológico**

La función principal del sistema inmunológico del huésped es la protección contra la invasión viral, bacteriana y parasitaria. Las respuestas inmunitarias del huésped se inician mediante el reconocimiento de antígenos patógenos durante la invasión ⁵¹. La señal reconocida es transducida y amplificada por diversas vías de transducción de señalización inmunitaria. Para defenderse de estas respuestas, los patógenos utilizan estrategias específicas para suprimir el sistema inmunitario del huésped, así como se observa en la figura 17. Una de estas estrategias es la producción de inmunosupresores ya sea por secreción o presentación en la superficie de la célula huésped o autóloga. En este contexto, se pueden aplicar aptámeros para bloquear inmunosupresores patógenos para recuperar el sistema inmunológico del huésped ⁴⁵.

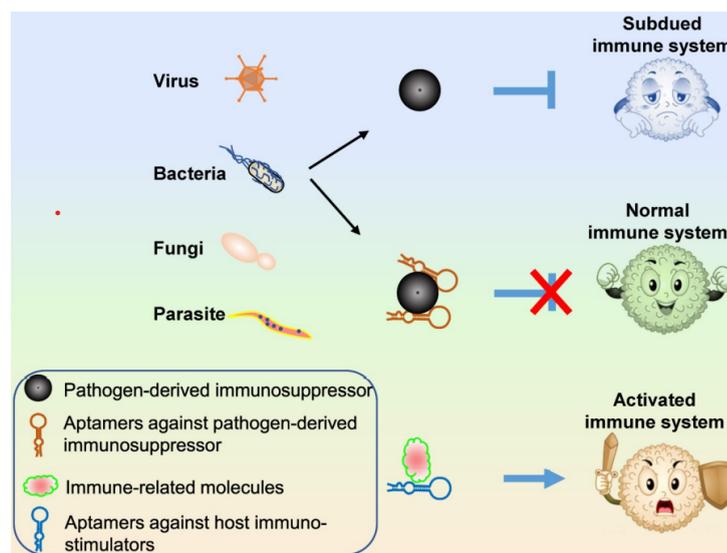


Figura 17. Representación esquemática de aplicaciones de aptámeros en la mejora de la inmunidad del huésped durante la infección por patógenos. ⁴⁵

Tipo De Investigación y Metodología

Esta investigación es cualitativa y de carácter documental la cual mediante revisión bibliográfica disponible en base de datos en inglés y español (eje. PUBMED, Oxford AcadeCMIs Journal, Mendeley, Sciencedirect, SpringerLink, entre otras). Se realiza una recopilación de la información en los diferentes artículos de investigación, artículos de revisión que van desde el año 2001 hasta la actualidad, y también se soporta información de libros que estén relacionados con el uso de aptámeros como nueva herramienta diagnóstica para leishmaniosis. Estos artículos se leyeron, interpretaron y analizaron para escribir la revisión.

Universo y Población

Información disponible en bases de datos en inglés y español: artículos de investigación, artículos de revisión, informes, libros y páginas web relacionadas con el uso de Aptámeros para el Diagnóstico de Leishmania.

Muestra

Se realizó búsqueda bibliográfica en artículos científicos publicados desde el año 2001 hasta el año 022 que recopile información del uso de aptámeros , del comportamiento, tratamiento y diagnóstico de la leishmania en el territorio.

Resultados y discusión

Se realizó la revisión de 100 documentos procedentes de diferentes bases de datos, las cuales fueron: PUBMED, Nature, Oxford AcadeCMIs Journal, Mendeley, Sciencedirect, SpringerLink, entre otras, de los cuales se seleccionaron 52 documentos que corresponden con el tema a tratar en esta investigación (Figura 18).



Figura 18. Totalidad de documentos revisados y seleccionados. Elaboración propia

Para la revisión realizada se tuvieron en cuenta artículos tanto en inglés como español siendo este último el idioma más prevalente en la investigación.

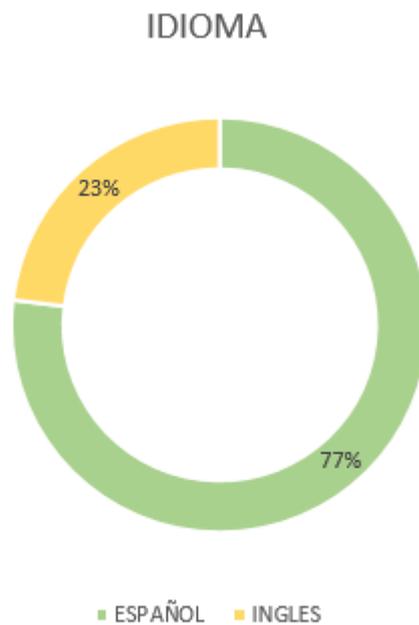


Figura 19. Idiomas considerados en la búsqueda bibliográfica

En la revisión bibliográfica se utilizaron artículos comprendidos desde el año 2001 hasta el presente año, siendo del año 2021 la mayoría de ellos, con el fin de realizar lo más actualizada posible la investigación (Figura 20).

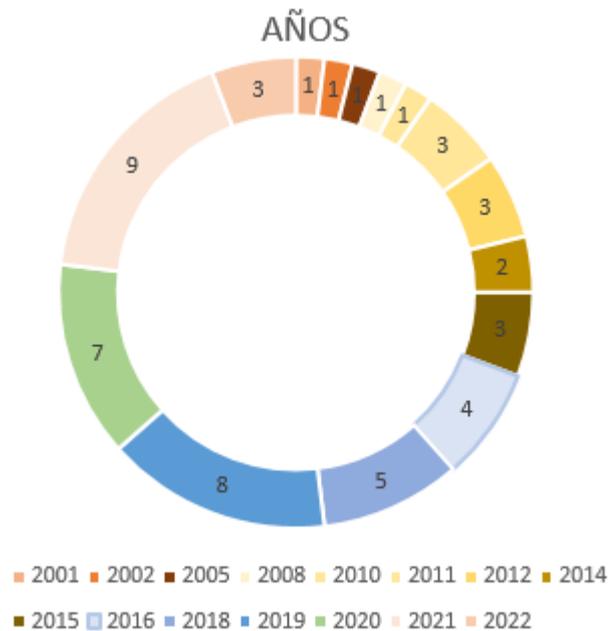


Figura 20. Años de los artículos utilizados

Los tipos de referencias consultadas se clasificaron en tres grupos, un 51% fueron artículos de revisión, 16 % páginas web y el 33 % artículos de investigación.

Los aptámeros son secuencias de ADN o ARN de cadena sencilla que tienen como ventaja la capacidad para unirse a moléculas diana lo que permite que sean específicos y se puedan focalizar hacia el objetivo, además de contar con una mayor estabilidad térmica y química frente a otros métodos.³⁸

Se pudo indagar acerca de la estructura que le permite a los aptámeros llegar a ser una buena herramienta para diagnosticar estas enfermedades; debido a que los aptámeros al ser de DNA y RNA se pudieron obtener mediante selección in vitro y han ido evolucionando de la misma manera. Estos son seleccionados a partir de poblaciones combinatorias mediante un proceso conocido como SELEX el cual les concede la capacidad de unirse específicamente a un determinado ligando. Desde la aparición de este método en 1990, se han obtenido numerosos aptámeros con alta especificidad y afinidad frente a un amplio rango de moléculas diana,

entre ellas proteínas, ácidos nucleicos y complejos macromoleculares que tienen gran relevancia.

La tecnología ya estructurada de los aptámeros empezó en este mismo año cuando tres grupos de investigación descubrieron que los ácidos nucleicos, además de tener un papel en la replicación, transcripción y traducción, tenían la capacidad de plegarse y adquirir estructuras tridimensionales únicas que le permitían unirse de forma específica a una amplia gama de moléculas orgánicas, lo cual les confiere una alta afinidad y especificidad de reconocimiento, adicionalmente se identificaron las características que se requieren para obtener un aptámero específico para la identificación de estos parásitos como lo son capacidad de conservación a largo plazo en temperatura ambiente, su alta pureza y su fácil obtención, ya que al ser *in vitro* no depende de células o animales por lo que se considera un proceso sencillo y reproducible con muy poca variedad entre sus producciones, además de permitir elegir las condiciones de selectividad para obtener aptámeros con las condiciones deseadas para el diagnóstico de la enfermedad.

El propósito de utilizar los aptámeros como método diagnóstico de parasitosis de importancia en la salud pública es lograr detectar proteínas específicas de cada parásito, como por ejemplo en el caso de *Leishmania* principalmente se busca detectar la proteína H3 lo cual se logra aislado un grupo de aptámeros obtenidos de una secuencia específica de ADN del parásito el cual es llamado SELH3, este se une a *Leishmania infantum* H3 con alta afinidad y especificidad, lo que le confiere a esta nueva población de aptámeros anti-H3 tener una aplicación potencial como sistema de diagnóstico para la leishmaniosis.

En cuanto a candidatas para el diagnóstico de leishmania la proteína histona H2A juega un papel importante ya que por medio de la técnica SELEX, se logró que aptámeros de ADN reconocieran de manera específica el antígeno H2A de *L. infantum* con un límite de detección de (50 ng), otra técnica que ha tenido auge es la estandarización de oligonucleótidos por medio de ELONA, Western blot y slot blot que detectan específicamente a H2A lo que permitirá fortalecer el diagnóstico sobre todo en su forma visceral.

MÉTODO	APTÁMERO	RESULTADO	RANGO DE DETECCIÓN	BIBLIOGRAFÍA
SELEX	ADN	Pueden detectar el	42 a 59 nM	Ospina J.D. 2020

		parásito en muestras de pacientes. Agentes terapéuticos para bloquear vías metabólicas de <i>Plasmodium spp.</i>		
SELEX	ARN	Capacidad de reconocer la proteína recombinante DBL1 α	42 a 59 nM	Ospina J.D. 2020
SELEX	AptLiH2A#1	Reconoce H2A	50 nM	Martín, <i>et al.</i> 2020
SELEX	AptLiH2A#2	Reconoce H2A	50 nM	Martín, <i>et al.</i> 2020
SELEX	ApPABP#3	Reconocen la LiPABP	50 nM	Ospina J.D. 2020
SELEX	ApPABP#7	Reconocen la LiPABP	50 nM	Ospina J.D. 2020
SELEX	ApPABP#11	Reconocen la LiPABP	50 nM	Ospina J.D. 2020
ELONA	AptLiH3#4	Detecta la Proteína rLiH3	40 nM	Uah.es. 2021
ELONA	AptLiH3#10	Detecta la Proteína rLiH3	40 nM	Uah.es. 2021

Posteriormente, Martín, *et al.*⁹, aislaron dos aptámeros, el AptLiH2A#1 y el AptLiH2A#2, a partir del grupo (*pool*) SELH2A previamente obtenido, los cuales reconocen H2A con una constante de disociación en un rango muy bajo, del orden nanomolar (nM). Estos aptámeros purificados pueden sintetizarse, por lo que serían más prácticos a la hora de desarrollar una nueva herramienta diagnóstica.

Se han identificado aptámeros de ADN contra la proteína PABP de *L. infantum* que, como ya se mencionó, es una proteína fundamental para el proceso de corte y poliadenilación de los 3'UTR de los ARN mensajeros. Luego de cuatro rondas de selección, se purificaron tres aptámeros: ApPABP#3, ApPABP#7 y ApPABP#11, los cuales reconocen la LiPABP con gran afinidad (50 nM). Además, el ApPABP#11 interrumpe la unión de la LiPABP a la cola de poliA de los ARN mensajeros *in vitro*. Estos aptámeros podrían usarse en investigación para

purificar la LiPABP y para diagnóstico; incluso, el ApPABP#11 podría usarse como agente terapéutico debido a su capacidad de inhibir la unión de la LiPABP a la cola de poliA ⁹.

Conclusiones

Se pudo recopilar en diversas fuentes bibliográficas evidencia sobre el uso de los aptámeros para el diagnóstico de Leishmaniasis; debido a que estas moléculas han tomado mayor importancia en los últimos años, ha aumentado el número de publicaciones en las que se resalta la importancia de estos y cómo podrían aplicarse en zonas endémicas para así mejorar la eficacia y calidad de los resultados.

Se pudo indagar acerca de la estructura que le permite a los aptámeros llegar a ser una buena herramienta para diagnosticar estas enfermedades, adicionalmente se identificaron las características que se requieren para obtener un aptámero específico para la identificación de estos parásitos.

El método SELEX permite la producción o síntesis de los aptámeros de los puntos específicos de interés a partir de rondas de selección y amplificación, debido a esto el proceso es sencillo y reproducible, además permite elegir las condiciones de selectividad para obtener aptámeros con las condiciones deseadas para el diagnóstico de la enfermedad.

Los aptámeros ofrecen grandes ventajas, como su fácil producción in vitro, las modificaciones químicas que pueden ser incorporadas para mejorar su estabilidad en las muestras biológicas, el reconocimiento de blancos inmunógenos y no inmunógenos, su estabilidad a altas temperaturas y su capacidad de renaturalizar.

Bibliografía

1. Ospina Juan. Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología. [citado el 06 de abril de 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/843/84364335017/html/>
2. Animales (zoonóticos) [Internet]. cdc.gov. 2019 [citado el 12 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/es/animals.html>

3. Ho V. ¿Qué son los parásitos y qué enfermedades nos causan? [Internet]. La conversación. 2019 [citado el 12 de abril de 2022]. Disponible en: <https://theconversation.com/que-son-los-parasitos-y-que-enfermedades-nos-causan-127341>
4. Rae.es. [citado el 12 de abril de 2022]. Disponible en: <https://dle.rae.es/reservorio>
5. Molano Cetina LG. Enfermedades transmitidas por vectores. Biomédica [Internet]. 2011 [citado el 12 de abril de 2022];31(sup3.1):110. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
6. Researchgate.net. [citado el 19 de julio de 2022]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/358752711_Isolation_of_DNA_aptamers_as_a_potential_tool_for_Leishmaniasis_diagnosis
7. www.bvsalud.org. [citado el 12 de abril de 2022]. Disponible en: <https://docs.bvsalud.org/oer/2018/10/3812/u4-leish02.pdf>
8. Leishmaniasis [Internet]. Paho.org. [citado el 26 de octubre de 2021]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/leishmaniasis>
9. Ospina J.D. Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología. Biomédica [Internet]. 2020 [citado el 12 de abril de 2022];40(Supl. 1):148–65. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/4765/4629>
10. Velez ID, Hendrickx E, Robledo SM, Agudelo S del P. Leishmaniosis cutánea en Colombia y género. Cad Saude Publica [Internet]. 2001 [citado el 19 de julio de 2022];17(1):171–80. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/csp/a/4vKfrDPjnOC6nhK6VPR88nR/?lang=es>
11. Hernandez FJ, Botero JA. Aptámeros: agentes diagnósticos y terapéuticos. [Internet]. 2012. [Citado el 12 de abril de 2022]. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/iatreia/article/view/11956/10834>
12. Ramírez JD, Hernández C, León CM, Ayala MS, Flórez C, González C. Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. Sci Rep [Internet]. 2016 [citado el 17 de mayo de 2022];6(1):1–10. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep28266?report=reader>
13. Brote urbano de leishmaniasis en Colombia. 2018. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-00642018000100089
14. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. 2020. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s12639-020-01212-w.pdf>

15. Aptamers as a novel diagnostic and therapeutic tool and their potential use in parasitology. 2020.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32463617/#:~:text=They%20can%20potentially%20be%20used,nanoparticle%20markers%2C%20among%20other%20applications.>
16. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. 2021.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7966913/>
17. Isolation of DNA aptamers as a potential tool for Leishmaniasis diagnosis. 2022.
https://www.researchgate.net/publication/358752711_Isolation_of_DNA_aptamers_as_a_potential_tool_for_Leishmaniasis_diagnosis
18. Osorio M, Caraballo A, Sanchez M. a referencia es Isolation of DNA aptamers as a potential tool for Leishmaniasis diagnosis. [Internet]. 2021 [citado el 12 de abril de 2022]. Disponible en:
<http://japtamers.co.uk/isolation-of-dna-aptamers-as-potential-tools-for-leishmaniasis-diagnos/s/>
19. Pereira Á, Pérez M. Leishmaniosis. Offarm [Internet]. 2002 [citado el 12 de abril de 2022];21(9):116–24. Disponible en:
<https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-leishmaniosis-13038008>
20. https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fbuleria.unileon.es%2Fbitstream%2F10612%2F5144%2F1%2Ftesis_5d262d%2520%25281%2529.PDF&psig=AOvVaw15miWGPpAT5xmwL5Tvwmjc&ust=1651112705019000&source=images&cd=vfe&ved=0CA0QjhXqFwoTCLio4MqYs_cCFOAAAAAdAAAAABB6
21. Gov.co. [citado el 12 de abril de 2022]. Disponible en:
<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/PAI/Lineamientos-leishmaniasis.pdf>
22. Leishmaniasis [Internet]. Quién.int. [citado el 12 de abril de 2022]. Disponible en:
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
23. Gov.co. [citado el 18 de julio de 2022]. Disponible en:
<https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/LEISHMANIASIS%20CUTANEA%202022.pdf>
24. OPS.org. [citado el 12 de abril de 2022]. Disponible en:
https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50524/9789275320631_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
25. Msdmanuals.com. [citado el 27 de abril de 2022]. Disponible en:
https://www.msdmanuals.com/-/media/manual/professional/images/4/1/7/417_cutaneous_leishmaniasis_slide_11_springer_high_es.jpg?mw=350&thn=0&sc_lang=es

26. Gstatic.com. [citado el 27 de abril de 2022]. Disponible en:
<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRoEZivSIMbFb57IROOt9nA5GXGwqwXHp0siABVmF-3qd6OSTsB0oXiPsu18IZ3NvRPIF0&usqp=CAU>
27. Gstatic.com. [citado el 27 de abril de 2022]. Disponible en:
<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcT30xR4fSVuNjRCUiiTD9vo2RHmU9mEmnLoNg&usqp=CAU>
28. Elsevier.es. [citado el 27 de abril de 2022]. Disponible en:
<https://multimedia.elsevier.es/PublicationsMultimediaV1/item/multimedia/S169540332030148X:gr1.jpeg?xkr=ue/ImdikoIMrs.JoerZ+w9/qVHBXBqbSQ7FNUvNof+6+l4v03CmyaR9Rm+q8TRfDERovN5wMUMDVyYvA+rI0XvFydf8cmZYr/97N5g2MJf7ePrfucqNxOGhNfuWJT5TXNr3K2ZCO+GyTmTllkMehdwY33GE3zX8Dx06Fxp919K7Q2GiiQe6L7HdTBRU4Tk uLbKFWNi4ddOwduse74b8PiTfEoY5g7r.JyeO6/hoaA9l+sNqkLZBbFB+Pjhi9KP7VtsjQWf1yNXU4b/uhktiqsnflx/IO5Es7GNt/xy/bMKGk0=>
29. No title [Internet]. Researchgate.net. [citado el 27 de abril de 2022]. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/26811784/figure/fig1/AS:601231437357059@1520356153532/Figura-1-Leishmaniasis-mucocutanea-antes-del-tratamiento-Lesion-destructiva-de-l-labio_Q320.jpg
30. Paho.org. [citado el 27 de abril de 2022]. Disponible en:
https://www.paho.org/sites/default/files/styles/max_650x650/public/2019-12/leishmaniasis_viscerai.jpg?itok=BWDY7YeE
31. Rosal Rabes T del, Baquero-Artigao F, García Miguel MJ. Leishmaniosis cutánea. Pediatría primaria [Internet]. 2010 [citado el 26 de abril de 2022];12(46):263–71. Disponible en:
https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-76322010000300009
32. Leishmaniosis (leishmaniosis) [Internet]. Manual MSD versión para público general. [citado el 26 de abril de 2022]. Disponible en:
<https://www.msmanuals.com/es-co/hogar/infecciones/infecciones-parasitarias-protozoos-extraintestinales/leishmaniasis-leishmaniosis>
33. Sánchez J.D. OPS/OMS [Internet]. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. [citado el 26 de abril de 2022]. Disponible en:
https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420:2012-leishmaniasis-visceral&Itemid=39347&lang=es
34. Vista de Leishmaniasis visceral en América Latina y perspectivas terapéuticas [Internet]. Edu.co. [citado el 26 de abril de 2022]. Disponible en:
<https://revistamvz.unicordoba.edu.co/article/view/1077/pdf>
35. Hernández FJ, Botero Hincapié JA. Aptámeros: agentes diagnósticos y terapéuticos. IATREIA [Internet]. 2012 [citado el 12 de abril de 2022];25(2):159–68. Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932012000200008

36. Hernández FJ, Hincapié JAB. Aptámeros: agentes diagnósticos y terapéuticos. IATREIA [Internet]. 2012 [citado el 27 de abril de 2022];25(2):159–68. Disponible en: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/iatreia/article/view/11956>
37. No title [Internet]. Google.com. [citado el 27 de abril de 2022]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=https://www.ucm.es/data/cont/docs/136-2015-01-27-Apt%25C3%25A1meros.pdf&ved=2ahUKewj8oe-0rrP3AhUyVTABHcwYCEkQFnoECCAQAQ&usg=AOvVaw3ObpEwX6Y2je_-G4ilnHKA
38. Repositorioinstitucional.mx. [citado el 26 de abril de 2022]. Disponible en: https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/2081/1/tesis_L%C3%B3pez_Santini_Brianda_Paola_07_mayo_2018B.pdf
39. Vista de Aptámeros: agentes diagnósticos y terapéuticos [Internet]. Edu.co. [citado el 26 de abril de 2022]. Disponible en: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/iatreia/article/view/11956/10834>
40. Wan Q, Liu X, Zu Y. Aptámeros de oligonucleótidos para la detección de patógenos y el control de enfermedades infecciosas. Theranostics [Internet]. 2021 [citado el 26 de abril de 2022];11(18):9133–61. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7150/thno.61804>
41. Luisina. Aptámeros en dispositivos diagnósticos [Internet]. NotiWiener Digital. [Internet]. 2015 [citado el 27 de abril de 2022]. Disponible en: <https://notiwiener.net/2015/02/aptameros-en-dispositivos-diagnosticos/>
42. Adachi T, Nakamura Y. Aptamers: A review of their chemical properties and modifications for therapeutic application. Molecules [Internet]. 2019 [citado el 27 de abril de 2022];24(23):4229. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31766318/>
43. Hernández FJ, Andrea J, Hincapié B. Aptámeros: agentes diagnósticos y terapéuticos [Internet]. Org.co. [citado el 27 de abril de 2022]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/iat/v25n2/v25n2a08.pdf>
44. Lasa I, Pozo JL del, Penadés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. An Sist Sanit Navar [Internet]. 2005 [citado el 27 de abril de 2022];28(2):163–75. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300002
45. Biomedcentral.com. [citado el 27 de abril de 2022]. Disponible en: <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-019-0611-0#:~:text=The%20aptamer%2Dbased%20systems%20have,can%20be%20used%20in%20drug>
46. Wan Q, Liu X, Zu Y. Oligonucleotide aptamers for pathogen detection and infectious disease control. Theranostics [Internet]. 2021 [citado el 27 de abril de 2022];11(18):9133–61. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7150/thno.61804>
47. León W. Universidad de Santander. Aptasensor “in silico” para Detección de E. coli. [Internet]. 2020. [citado el 27 de abril de 2022]. Disponible en: <https://repositorio.udes.edu.co/bitstream/001/5527/1/Evaluaci%C3%B3ndelApt%C3%A1mer>

[oDise%C3%B1ado%E2%80%9Cin%20silico%E2%80%9Dpara laDetecci%C3%B3nElectroqu%C3%ADmicadeEscherichiacoliO157H7enMatricesAcuosas.pdf](#)

48. Propiedades generales de los virus [Internet]. Mhmedical.com. [citado el 28 de abril de 2022]. Disponible en:
<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1507§ionid=102894197>
49. Doctoral T, Rodríguez P, Julio R. Nueva Estrategia Basada en la Utilización de Aptámeros como Antivirales Contra el Virus de la Gripe y Estudio de los Mecanismos de Control de la Expresión Génica Viral [Internet]. Uam.es. [citado el 28 de abril de 2022]. Disponible en:
https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/676759/rodriguez_rodriguez_paloma.pdf?sequence=1
50. Marcano D. El Lado Positivo de las Bacterias. [Internet]. 2008. [citado el 28 de abril de 2022]. Disponible en:
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772008000200009
51. Toledo J. Universidad de Sevilla. Desarrollo in vitro de Nuevas Terapias Dirigidas con Nanopartículas para el Tratamiento del Cáncer de Tiroides [citado el 27 de abril de 2022]. Disponible en:
https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/72456/file_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y
52. Uah.es. [citado el 20 de septiembre de 2022]. Disponible en:
<https://ebuah.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/50658/Tesis%20Valerio%20Frezza.pdf?sequence=1&isAllowed=y>