



UNIVERSIDAD CES

Un compromiso con la excelencia

**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA POR MEDIO DE LA
ESTRATEGIA Bio-SELEX EN CEPAS COLOMBIANAS**

Wendy Yulieth Royero Bermeo

Tutor

Juan David Ospina Villa

Cotutor

Miryan Margot Jiménez Sánchez

MAESTRIA EN MEDICINA TROPICAL

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD CES

AÑO

2025

AGRADECIMIENTOS

A mi amado compañero de vida, por su infinita paciencia, su amor constante y su compañía.

A mi gato, por su silenciosa presencia durante las eternas noches de estudio.

*A mi tutor de tesis, por su paciente y muy peculiar manera de motivar, enseñar y –cuando se alineaban los chakras–
felicitar.*

A mi cotutora, por su amorosa forma de corregir y su confianza.

A mis compañeros, que se convirtieron en amigos durante este proceso.

Gracias.

INDICE

RESUMEN.....	6
1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	7
1.1 Planteamiento del problema.....	7
1.2 Justificación.....	9
Diagrama del problema.....	10
1.3 Pregunta de investigación.....	11
2. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1 MARCO CONCEPTUAL.....	12
Epidemiología.....	12
Panorama mundial.....	12
Región de las Américas.....	12
Colombia.....	13
Biología del parásito.....	14
GÉNERO <i>Plasmodium</i> spp.....	14
Ciclo de vida de <i>P. falciparum</i>	14
Ciclo de vida de <i>P. vivax</i>	15
Métodos diagnósticos.....	17
Diagnóstico clínico.....	17
Diagnóstico microscópico.....	17
Pruebas rápidas.....	18
Diagnóstico molecular.....	19
Tecnología SELEX.....	19
Variantes de la tecnología SELEX.....	20
Cell- SELEX.....	20
In vivo SELEX.....	20
CE-SELEX.....	20
Bio-SELEX.....	21
2.2 ESTADO DEL ARTE.....	22
Aptámeros contra <i>Plasmodium</i> spp.....	22
Aplicaciones diagnósticas.....	23
Aplicaciones terapéuticas.....	25
Aptámeros vs. Anticuerpos.....	25
2.3 Marco legal.....	28
Algoritmo diagnóstico de malaria.....	29

3.	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo general	30
3.2	Objetivos Específicos	30
4.	METODOLOGÍA	31
4.1	Diseño y enfoque metodológico de la investigación	31
4.2	Tipo de estudio	31
4.3	Población y muestra	31
	Población de estudio	31
4.4	Recolección de datos y muestras	32
4.4.1	Fuentes de Información	32
4.4.2	Técnicas e Instrumentos de recolección	32
	Recolección y procesamiento de muestras clínicas fase I	32
	Detección molecular del género <i>Plasmodium</i> spp	34
	Procedimiento Bio-SELEX	36
	Proceso SELEX	36
4.5	Análisis estadísticos y bioinformáticos	40
	Secuenciación y análisis bioinformático	40
	Síntesis del aptámero	41
	Evaluación de la interacción aptámero-proteína	41
	Recolección y uso de muestras clínicas (Fase II)	41
	Ensayo de retardamiento de movilidad electroforética (EMSA)	42
	Pull-Down	42
	Filtrado bioinformático por peso molecular	43
5.	RESULTADOS	45
	Patrones sociodemográficos	45
	Identificación de aptámeros y Biomarcadores	46
	Validaciones funcionales	54
	Resultados del filtrado bioinformático por peso molecular	57
6.	DISCUSIÓN	59
7.	CONCLUSIONES	67
	BIBLIOGRAFÍA	72

RESUMEN

La malaria sigue siendo una enfermedad de gran relevancia epidemiológica en Colombia, con alta incidencia en regiones como el Chocó. La identificación de biomarcadores moleculares reconocidos por aptámeros es fundamental para el desarrollo de estrategias diagnósticas más sensibles y confiables. El objetivo de este estudio fue identificar y caracterizar aptámeros con potencial diagnóstico diferencial frente a *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, mediante la estrategia Bio-SELEX aplicada a muestras de sangre total, tomadas de pacientes de zonas endémicas, provenientes del departamento de Chocó, Colombia.

Se realizaron rondas positivas y negativas de selección *in vitro*, dirigidas a depurar secuencias con afinidad no deseada hacia proteínas humanas y hacia la especie de *Plasmodium* específica. Como resultado, se identificaron dos aptámeros individuales: uno con afinidad hacia *P. falciparum* y otro hacia *P. vivax*. A partir de las secuencias seleccionadas, se diseñaron dos aptámeros modulares, respectivamente, que integraron los fragmentos más conservados y funcionales de cada conjunto.

Las secuencias fueron evaluadas funcionalmente mediante ensayos de movilidad electroforética en gel (EMSA) y Pull-Down. Aunque no se realizó la identificación directa de las proteínas mediante espectrometría de masas, se aplicó un filtrado bioinformático basado en el peso molecular de las bandas retenidas, lo que permitió postular candidatos proteicos potencialmente relevantes a partir de bases de datos de proteoma del *Plasmodium spp.*

Los resultados obtenidos constituyen una validación funcional preliminar de los aptámeros diseñados, tanto individuales como modulares, y demuestran la eficacia de la estrategia Bio-SELEX en el contexto de muestras clínicas colombianas. Estos hallazgos representan un aporte relevante en la búsqueda de biomarcadores aptámero-específicos para el diagnóstico diferencial de especies de *Plasmodium* en regiones endémicas.

1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema

La malaria es una enfermedad febril aguda causada por protozoos del género *Plasmodium*. De las más de 200 especies conocidas, solo se le ha atribuido capacidad de infectar al ser humano a cinco de ellas: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*(1). A pesar de los avances en su control y tratamiento, esta enfermedad sigue representando una amenaza significativa para la salud pública mundial. Según el World Malaria Report 2024, se reportaron 263 millones de casos y 597 000 muertes en 83 países durante el año 2023, lo que representa un aumento de 11 millones de casos en comparación con 2022(2,3).

En el continente americano, aunque se evidenció una reducción sostenida de la carga de malaria en las últimas dos décadas, esta tendencia se ha estancado. Entre 2000 y 2023, los casos disminuyeron en un 65 % (de aproximadamente 1,6 millones a 550 000), y las muertes, en un 72 % (342 defunciones en 2023). No obstante, entre 2022 y 2023 se observó un repunte del 5 %, alejando a la región del cumplimiento de las metas propuestas en la Estrategia Técnica Global. Brasil, Venezuela y Colombia concentraron cerca del 77 % de los casos en la región, seguidos por Guyana y Perú(3). Estos datos reflejan una compleja interacción de factores socioambientales y climáticos, incluyendo la expansión de la minería aurífera, la deforestación amazónica y los efectos del fenómeno El Niño, que han modificado patrones de temperatura y precipitación, favoreciendo la proliferación del vector *Anopheles darlingi*. Se ha estimado que un aumento de 1 °C en la temperatura podría incrementar la transmisión de la malaria entre un 10 % y un 80 %, dependiendo de la altitud(4). Colombia mantiene una transmisión activa de la enfermedad. Según el último boletín epidemiológico del Instituto Nacional de Salud, hasta la semana 28 del año 2025 se notificaron 43.885 casos acumulados: el 67,2 % (29.491) causados por *P. vivax* y el 31,6 % (13.898) por *P. falciparum*(5). Esta distribución, que contrasta con la tendencia global dominada por *P. falciparum*, se relaciona con las condiciones eco epidemiológicas particulares de la Amazonia y la región Pacífica colombiana, donde predominan vectores del subgénero *Nyssorhynchus*, favoreciendo la transmisión de *P. vivax*(6).

Las pruebas diagnósticas rápidas (RDTs) disponibles en el mercado han mostrado una elevada sensibilidad para la detección de *P. vivax*(7); no obstante, estudios comparativos revelan que su desempeño frente a *P. falciparum* es inferior, hecho que respalda la hipótesis de que deleciones en los genes que codifican proteínas diana HRP2 y HRP3 reducen la sensibilidad de estas pruebas(8,9). Estudios recientes en Colombia reportan un aumento de resultados discordantes entre las RDTs y la microscopía de extendido de sangre periférica en El riesgo se agrava pacientes infectados por *P. falciparum*, atribuible a la circulación de cepas con mutaciones en las proteínas blanco HRP2 y HRP3 detectadas por las pruebas comercializadas(10). Esta problemática es especialmente crítica en el contexto colombiano, donde las RDTs para malaria mixta se basan en la detección de la proteína PvLDH para identificar *P. vivax* y de HRP2/3 para diagnosticar *P. falciparum*. Algunas pruebas, además, combinan un antígeno pan-*Plasmodium* con HRP2/3 para diferenciar *P. falciparum* de las demás especies(11). La presencia de cepas con deleciones en los genes *Pfhrp2* y *Pfhrp3* puede generar falsos negativos, comprometiendo la sensibilidad diagnóstica y conduciendo a errores terapéuticos. El riesgo se intensifica en comunidades remotas sin personal entrenado en microscopía, donde la población depende exclusivamente de las RDTs: un resultado erróneo expone al paciente a efectos adversos por tratamientos innecesarios(12), incrementa la probabilidad de malaria grave por terapias inadecuadas(13), favorece la aparición de resistencia antipalúdica(14) y distorsiona los registros de incidencia en el sistema de vigilancia epidemiológica SIVIGILA. Un diagnóstico certero y oportuno es esencial para prevenir complicaciones, orientar el tratamiento y reducir la transmisión(15,16).

En la búsqueda de métodos diagnósticos que superen las limitaciones de la microscopía, como lo es el sesgo del operador o la PCR, con su alto costo, sumado a la necesidad de una infraestructura adecuada, y las pruebas rápidas afectadas por deleciones en *Pfhrp2/Pfhrp3*, los aptámeros se perfilan como una alternativa prometedora. Los aptámeros son cadenas cortas de ADN o ARN de cadena sencilla que, gracias a su conformación tridimensional, se unen con alta afinidad y especificidad a blancos moleculares(17). A diferencia de los anticuerpos, los aptámeros se obtienen completamente *in vitro*, lo que facilita su producción, reduce costos y elimina la necesidad de animales de experimentación(18,19). . Además, presentan alta estabilidad térmica y química, lo cual los hace aptos para entornos con recursos limitados.

La obtención de aptámeros se realiza mediante la técnica SELEX (Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial), que consiste en someter una biblioteca aleatoria de oligonucleótidos a rondas sucesivas de selección contra un blanco específico. Una variante más reciente, conocida como Bio-SELEX, utiliza muestras biológicas completas en la etapa de selección, lo que permite aislar aptámeros contra biomarcadores endógenos, clínicamente relevantes y representativos de la población local(20).

La versatilidad de los aptámeros se refleja en su amplio espectro de usos. Diversas investigaciones demuestran su capacidad para reconocer marcadores tumorales mutados, facilitando tanto la detección selectiva de células cancerígenas como nuevas estrategias terapéuticas(21–24). Adicionalmente, mediante modificaciones químicas, como lo son: enlaces 2'-fluoro, 2'-O-metilo o conjugados al polietilenglicol (PEG), pueden volverse resistentes a endonucleasas y reducir su aclaramiento renal, prolongando la vida media *in vivo* (25). Y no menos importante, aptámeros empleados como diagnóstico, que permiten la detección temprana y específica de múltiples patógenos y sus biomarcadores(26,27). La metodología SELEX también ha generado aptámeros frente a microorganismos como *Entamoeba histolytica* y *Leishmania* spp., donde se han aislado aptámeros que reconocen proteínas exclusivas del patógeno(28–30).

En malaria, los esfuerzos se han centrado en *P. falciparum* y *P. vivax* debido a la elevada carga de enfermedad y la pérdida de sensibilidad de las RDTs y los resultados reportados hasta la fecha confirman la viabilidad de los aptámeros para malaria, que identifica proteínas como: proteína rica en histidinas 2 de *P. falciparum* (PfHRP2), proteína Lactato deshidrogenasa de *Plasmodium* spp. (PLDH), proteína glutamato deshidrogenasa de *P. falciparum* (PfGDH) y biomarcadores emergentes, con límites de detección en el rango femtomolar y capacidad para discriminar parasitemias bajas donde las RDT convencionales fallan(31). Estos avances demuestran que los aptámeros pueden convertirse en la base de dispositivos portátiles, económicos y altamente sensibles, adaptados a contextos de baja infraestructura sanitaria y a las variantes genéticas de *Plasmodium* spp. que circulan en Colombia.

Pese a los avances descritos, la mayoría de los biomarcadores y aptámeros antipalúdicos han sido obtenidos a partir de cepas o antígenos provenientes de otras regiones geográficas. Dado que la variabilidad genética de *Plasmodium* spp. difiere no solo entre continentes sino incluso entre focos endémicos de un mismo país(32,33), persiste la necesidad de caracterizar biomarcadores de baja variabilidad genética presentes en los estadios sanguíneos de las cepas que circulan en Colombia.

El objetivo de esta tesis, por tanto, se centra en identificar biomarcadores mediante la aplicación de Bio-SELEX a muestras clínicas locales. La selección y validación funcional de aptámeros, así como el diseño de plataformas diagnósticas, quedarán fuera del alcance inmediato de este trabajo y constituirán etapas futuras una vez completada la caracterización del blanco molecular.

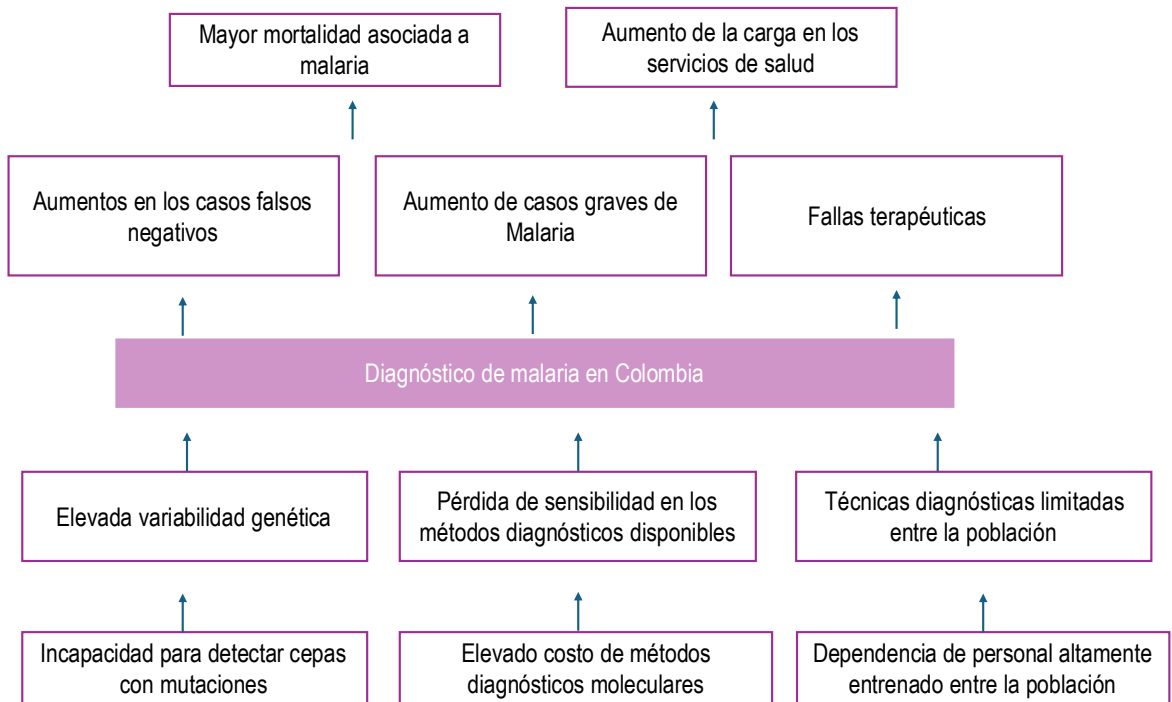
1.2 Justificación

La malaria continúa siendo una enfermedad de alta prioridad en salud pública, con más de 247 millones de casos y 619 000 muertes anuales, según el *World Malaria Report 2024* (3). Colombia enfrenta un panorama epidemiológico complejo, donde la especie *P. vivax* representa la mayoría de las infecciones, mientras que *P. falciparum* concentra los casos graves y la mayor letalidad(5).

La vigilancia diagnóstica afronta limitaciones críticas: la microscopía exige personal altamente entrenado; la PCR, infraestructura costosa; y las pruebas rápidas de diagnóstico (RDTs), si bien accesibles, muestran pérdida de sensibilidad en regiones donde circulan cepas con deleciones en los genes *Pfhrp2/3*, como la Amazonia y la franja Pacífica colombianas(34). Frente a esta problemática, surge la necesidad crítica de identificar biomarcadores locales con baja variabilidad genética, que permitan el desarrollo de métodos diagnósticos robustos y adaptados al contexto nacional. En este escenario, los aptámeros representan una alternativa promisoría. Estos oligonucleótidos estructurados presentan afinidades comparables a los anticuerpos, pueden ser optimizados químicamente, ofrecen estabilidad térmica y son de producción rentable (35,36). Además, su diseño se basa en estrategias como el Bio-SELEX, que permiten seleccionar secuencias específicas frente a dianas presentes en matrices biológicas reales, como los lisados parasitarios.

Este proyecto se enfoca en aplicar la estrategia Bio-SELEX para identificar biomarcadores sanguíneos de *P. falciparum* y *P. vivax* a partir de muestras clínicas colombianas. Esta aproximación no solo aborda las deficiencias diagnósticas de las RDTs convencionales basadas en antígenos recombinantes, sino que también sienta las bases para el desarrollo de plataformas aptámero-específicas aplicables en regiones con alta diversidad genética parasitaria y limitado acceso a servicios de salud. Con ello se contribuirá a reducir la carga de enfermedad, la mortalidad asociada y las brechas diagnósticas que perpetúan la transmisión en comunidades vulnerables.

Diagrama del problema



1.3 Pregunta de investigación

¿Cómo puede la estrategia Bio-SELEX, aplicada a cepas colombianas de *P. falciparum* y *P. vivax*, facilitar la identificación de biomarcadores con potencial diagnóstico para malaria?

2. MARCO TEÓRICO

2.1 MARCO CONCEPTUAL

Epidemiología

Panorama mundial

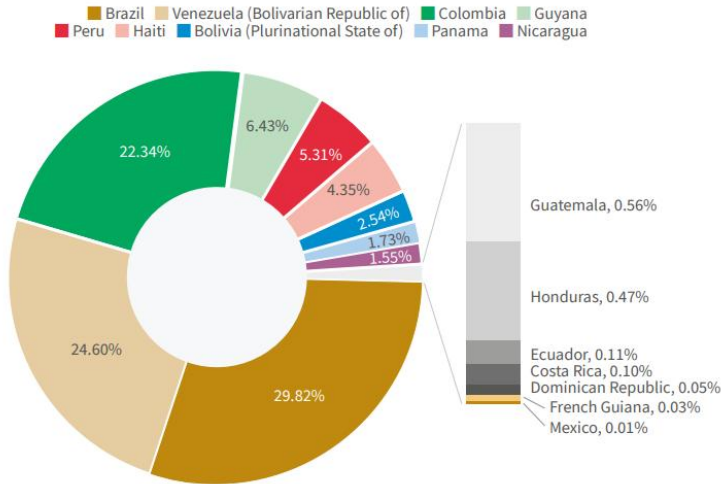
La malaria sigue siendo un problema prioritario de salud pública a escala mundial. El World Malaria Report 2024 indica que en 2023 se registraron 263 millones de casos y 597 000 muertes atribuibles a *Plasmodium* spp., lo que supone 11 millones de infecciones más que en 2022, mientras la mortalidad permaneció prácticamente estable(3). La carga no se distribuye de forma homogénea: la Región Africana soporta el 94 % de los casos (246 millones) y el 95 % de las muertes (569 000); le siguen Asia Sudoriental y la Región de las Américas, donde la transmisión persiste sobre todo en focos amazónicos y mesoamericano. A escala global, aproximadamente la mitad de la población sigue viviendo en zonas con riesgo de malaria, principalmente en áreas tropicales y subtropicales(37).

Si bien la mayoría de los casos se concentran en África, América Latina mantiene una transmisión persistente en múltiples focos endémicos. Esta situación, aunque menos dramática en términos absolutos, plantea retos específicos asociados a la coexistencia de *P. vivax* y *P. falciparum*, la dificultad en el acceso al diagnóstico oportuno y la alta movilidad de poblaciones en zonas mineras y selváticas

Región de las Américas

Entre 2000 y 2023, la Región de las Américas registró una disminución acumulada del 65,4 % en la incidencia de malaria y del 61,8 % en la tasa de mortalidad atribuible a la enfermedad, según la serie histórica de la OMS. No obstante, el progreso se ha ralentizado: en 2023, Brasil, la República Bolivariana de Venezuela y Colombia concentraron el 76 % de los casos notificados en la región. La especie dominante fue *P. vivax*, responsable de aproximadamente el 72,1 % de los casos, lo que pone de relieve la persistencia de reservorios hipnozoítos(38), la necesidad de estrategias enfocadas en la prevención de recaída y la detección de parasitemias submicroscópicas(39). La tendencia reciente muestra señales de reversión. Entre 2022 y 2023 se documentó un aumento interanual de casos en varios focos, incluidos Guayana Francesa, Panamá y Guatemala, atribuible a factores como cambios climáticos asociados a fenómeno del El Niño, migración laboral vinculada a la minería aurífera y deficiencias en la cobertura de diagnóstico y tratamiento(40).

En este mismo período, Colombia reportó la mayor cifra continental de infecciones por *P. falciparum*, lo que contrasta con la preponderancia regional de *P. vivax* y subraya la compleja heterogeneidad eco-epidemiológica del subcontinente. Esta distribución desigual de la carga de enfermedad se representa en la Figura 1, donde se observa que tres países concentran más del 75 % de los casos regionales, mientras que otras naciones presentan una carga residual o han logrado la eliminación.

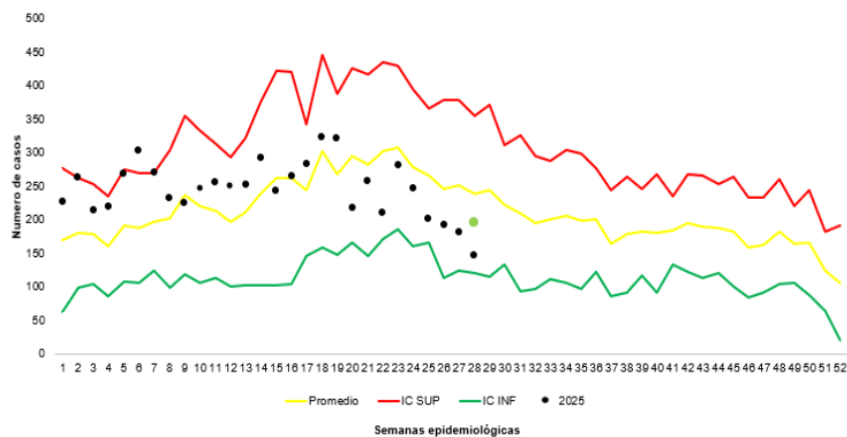


Notes: Belize and El Salvador were certified malaria free in 2023 and 2021, respectively; Suriname has reported zero indigenous cases since 2022.

Figura 1. Participación estimada por país en los casos de malaria reportados en la Región de las Américas en 2023. Brasil, Venezuela y Colombia concentran el mayor número de infecciones, con más del 75 % de los casos, según estimaciones de la OMS. Fuente: *World Malaria Report 2024*.

Colombia

De acuerdo con datos reportados por el Instituto Nacional de Salud, en Colombia, hasta la semana epidemiológica 28 del año 2025, se han registrado un total de 43.885 casos acumulados; el 67,2 % correspondió a *P. vivax* y el 31,7 % a *P. falciparum*. De los cuales 43.175 corresponden a casos de malaria no complicada, mientras que 710 se han identificado como casos de malaria complicada. Históricamente, se han identificado zonas con una mayor incidencia de malaria en Colombia, regiones como Chocó, Antioquia, Nariño, Córdoba, Vaupés, Bolívar, Cauca, entre otros, son algunos de los departamentos mayormente afectados. La Región Pacífica ha representado el 27.3% de los casos de malaria no complicada, caracterizándose por la predominancia de infecciones causadas por la especie *P. falciparum*(41).



Fuente: Sivigila, Instituto Nacional de Salud, Colombia 2025

Figura 2. Canal endémico de Malaria, Colombia. Semanas epidemiológicas del 01 a 28 de 2025.

Fuente: Sivigila, Instituto nacional de salud, Colombia 2025. El punto verde proyecta los casos de malaria para la semana epidemiológica 28, ya que por el rezago en la notificación de casos de malaria no se observa la situación real del país.

Este panorama epidemiológico se ve reflejado en el canal endémico nacional del mismo año, tal como lo muestra la figura. 2, donde se observa que, durante las primeras 20 semanas epidemiológicas, los casos reportados superaron de manera sostenida el límite superior del comportamiento histórico esperado, lo que indica una situación de alarma. Esta tendencia sugiere una circulación activa del parásito por encima del umbral endémico, posiblemente asociada a factores como condiciones climáticas favorables, circulación simultánea de especies, y barreras en el acceso a diagnóstico y tratamiento oportuno en regiones rurales. Posteriormente, a partir de la semana 21, se evidencia una disminución progresiva en el número de casos, con valores que comienzan a alinearse dentro del canal de éxito y, en algunos puntos, incluso por debajo del promedio esperado, indicando una posible estabilización del brote.

Biología del parásito

GÉNERO *Plasmodium* spp.

El género *Plasmodium*, perteneciente al dominio Eukaryota, filo Apicomplexa y familia Plasmodiidae, posee una distribución prácticamente mundial, con la única excepción de la Antártida; las regiones de mayor carga se concentran en África, América y Asia. La malaria es una enfermedad infecciosa aguda causada por parásitos de este género y se transmite al ser humano mediante la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* infectados. En la actualidad se reconocen cinco especies capaces de infectar a los seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y la zoonótica *P. knowlesi* (1). Entre ellas, *P. falciparum* y *P. vivax* son responsables de la mayor parte de los casos graves y de la mortalidad a escala mundial (37,42). Comprender el ciclo vital de estos parásitos es clave para el desarrollo de estrategias de intervención diagnóstica y terapéutica

Ciclo de vida de *P. falciparum*.

P. falciparum posee un ciclo de vida bastante complejo compuesto por tres etapas: dos ciclos intracelulares que se llevan a cabo dentro del huésped y un ciclo extracelular que se cumple dentro del mosquito de género *Anopheles*.

El proceso de infección inicia en el momento en que el mosquito hembra infectado pica e inyecta en el huésped esporozoítos que se encuentran alojados en sus glándulas salivales, los cuales migran a través del torrente sanguíneo hacia las células hepáticas, donde iniciará el ciclo esquizogónico asexual extra-eritrocitario, estas son invadidas a través de interacciones entre las proteínas del parásito y receptores presentes en la membrana de los hepatocitos, posteriormente cada esporozoítos modifica su morfología y se divide individualmente, dando lugar a la formación de ~30.000 merozoítos (43). Estos proliferan y causan la lisis de los hepatocitos y, con ello, su liberación al torrente sanguíneo infectando los hematíes en cualquiera de sus estadios de maduración, lo que da lugar a la sintomatología presentada por el huésped (44,45).

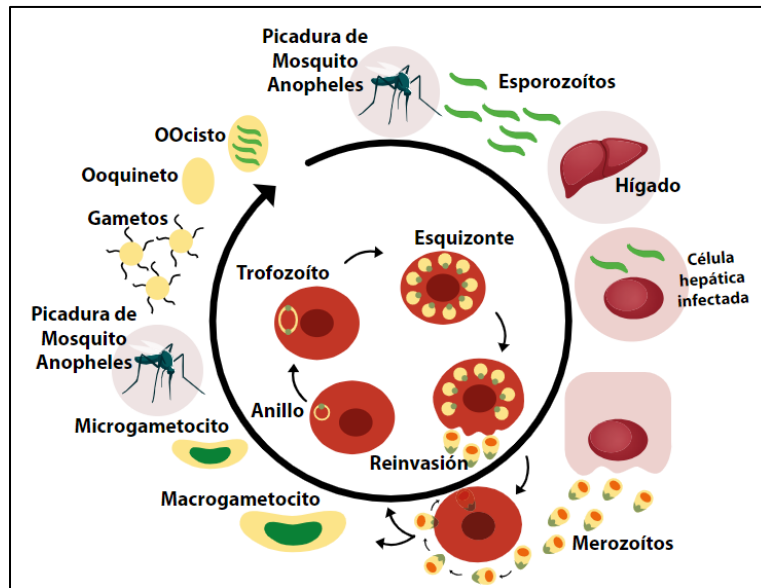


Figura 3. Ciclo de vida de *P. falciparum*.

Tomado de: Royero-Bermeo W, Reyes Santofimio CM, Franky Rojas MP, Picón Jaimes YA, Molina Franky J. Proteínas homólogas de unión a reticulocitos de *Plasmodium falciparum* involucradas en el proceso de invasión al eritrocito: revisión de la literatura. Rev Investig Salud Univ Boyacá. 2020;100-18.

Ciclo de vida de *P. vivax*

El ciclo de vida de *P. vivax* presenta marcadas similitudes con el proceso de invasión observado en la especie *P. falciparum*. Sin embargo, se evidencian diferencias significativas tras la culminación de la etapa de infección hepática.

En este punto, los merozoítos de *P. vivax* exhiben la peculiar capacidad de mantenerse en estado latente en las células hepáticas por extensos períodos, y reactivarse posteriormente, dando lugar a recaídas clínicas sin necesidad de nueva infección vectorial. Esta característica representa un desafío adicional para la eliminación de esta especie, particularmente en zonas de transmisión baja o intermitente(46). Dentro de la célula hepática se estima la formación de ~10.000 merozoítos (43), que son liberados al torrente sanguíneo. La secuencia del ciclo de vida continúa con la migración de los merozoítos hacia el torrente sanguíneo, donde se adhieren a los receptores presentes en los reticulocitos, específicamente a las proteínas de unión a Duffy (*Duffy-Binding protein, DBP*) y las proteínas de unión a reticulocito (*Reticulocyte-binding proteins, RBPs*) (47,48), a través de interacciones con la familia de proteínas de unión a reticulocitos *P. vivax Reticulocyte Binding Protein (PvRBP) family*, proceso que permite la entrada a la célula y finalmente da lugar a la formación de trofozoítos en el interior de la misma. Una de las principales diferencias entre las especies, radica en la capacidad que posee *P. vivax* para infectar solo glóbulos rojos en su estado inmaduro, a lo cual se le atribuye la baja parasitemia en comparación con lo observado en las infecciones por *P. falciparum* (49).

Una vez dentro del reticulocito, el parásito pasa por los estadios de anillo, trofozoíto y esquizonte, este último liberando nuevos merozoítos en ciclos de 48 horas, lo que origina la sintomatología febril característica. A diferencia de *P. falciparum*, *P. vivax* presenta una menor parasitemia, atribuida tanto a su especificidad celular como a una respuesta inmune más efectiva, aunque esto no descarta su potencial para producir cuadros graves en poblaciones vulnerables(50).

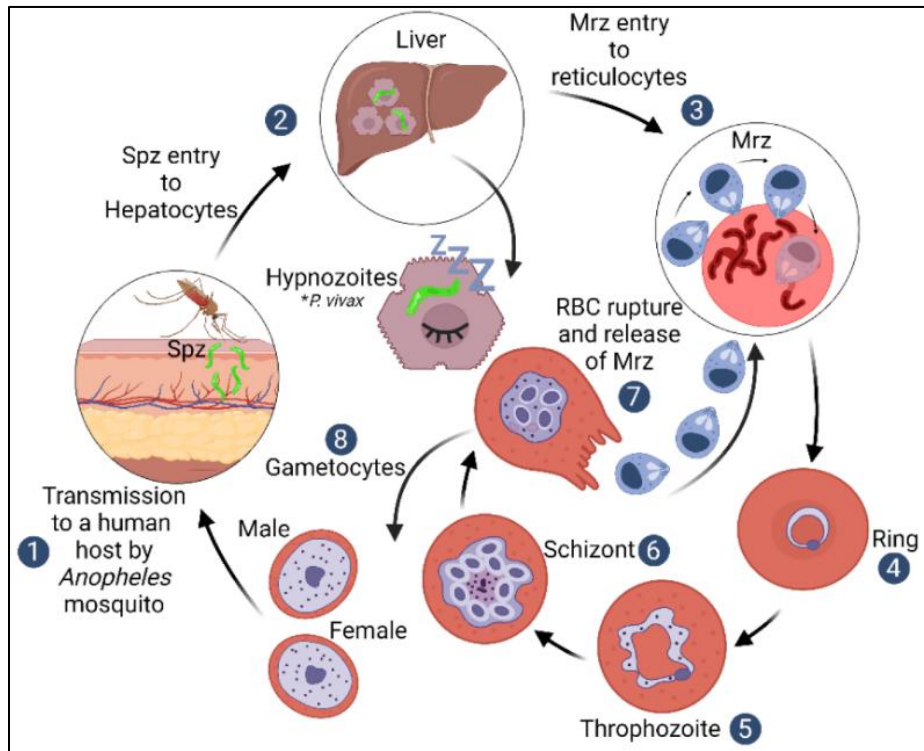


Figura 4. Ciclo de vida de *Plasmodium vivax* .

Tomado de: Molina-Franky J, Reyes C, Picón Jaimes YA, Kalkum M, Patarroyo MA. *The Black Box of Cellular and Molecular Events of Plasmodium vivax Merozoite Invasion into Reticulocytes. International Journal of Molecular Science.* enero de 2022;23(23):14528.

Simultáneamente, algunas formas intraeritrocíticas se diferencian en gametocitos, las células sexuales del parásito. Los gametocitos de *P. vivax* aparecen de forma temprana en el curso de la infección, lo que aumenta su eficiencia de transmisión. Cuando un mosquito se alimenta de sangre infectada, los gametocitos son ingeridos y comienzan su fase de reproducción sexual en el intestino medio del vector. Finalmente, los esporozoítos generados migran a las glándulas salivales del mosquito, cerrando el ciclo e iniciando uno nuevo en un hospedador susceptible(51).

Métodos diagnósticos

Diagnóstico clínico

Este diagnóstico se fundamenta principalmente en la sintomatología presentada por el paciente. Su utilización suele ser común en áreas endémicas, especialmente cuando no se dispone de métodos más avanzados para el diagnóstico(52,53). No obstante, estudios realizados han evidenciado que este método demuestra ser poco efectivo en términos de precisión diagnóstica, con una sensibilidad de 67% y una especificidad del 38%(54). Esta situación ha propiciado la administración de antipalúdicos a niños con fiebre que no padecen de malaria, la realización de diagnósticos erróneos de enfermedades cuyos síntomas son similares a los generados por el parásito, la implementación de tratamientos inapropiados, el derroche de ciclos de tratamiento antipalúdico y la exposición innecesaria a efectos adversos (55).

En contextos endémicos como Colombia, la presentación clínica de la malaria no siempre corresponde con la tríada clásica de fiebre, escalofríos y malestar general descrita en la literatura(56). Con frecuencia, los pacientes manifiestan síntomas inespecíficos que dificultan el reconocimiento temprano de la infección. Esta situación se agrava por el uso extendido de remedios caseros e infusiones tradicionales en las comunidades, prácticas que pueden atenuar transitoriamente la sintomatología sin eliminar el parásito(57,58), el resultado es la aparición de casos asintomáticos y submicroscópicos, que representan un desafío clínico y epidemiológico en Colombia: además de limitar la sensibilidad tanto de la microscopía como de los RDTs, estas formas clínicas contribuyen a una transmisión silenciosa y persistente del parásito, lo que compromete la eficacia de las estrategias de control y vigilancia(59). Por tanto, fortalecer este componente del análisis clínico y epidemiológico es crucial para mejorar la detección temprana y la respuesta en salud pública.

Diagnóstico microscópico

El diagnóstico microscópico de la malaria se realiza mediante la técnica conocida como gota gruesa, que implica la extracción de una pequeña muestra de sangre mediante una punción capilar en el dedo índice. El objetivo principal de la coloración es facilitar la identificación de las estructuras parasitarias, como el núcleo, el citoplasma y el pigmento malárico. Para este propósito, se emplean diversas técnicas de coloración derivadas de Romanowsky, tales como la coloración de Field, Giemsa, Wright y el Romanowsky modificado. En Colombia, específicamente en los puestos de microscopía, se prefiere utilizar la última mencionada debido a su estabilidad y su incapacidad para absorber la humedad ambiental. Esta característica es crucial en climas tropicales cálidos y húmedos, ya que al ser una solución acuosa, se mantiene óptima para el análisis microscópico (60).

Es cierto que, a pesar de ser una técnica relativamente simple y económica, su aplicación puede enfrentar desafíos significativos en áreas remotas o de difícil acceso. La necesidad de equipamiento específico, capacitación adecuada y suministros especializados puede limitar su aplicabilidad en lugares alejados de los centros urbanos o en regiones donde la infraestructura médica es limitada. A esto se suma que la sensibilidad de la microscopía no es uniforme: bajo condiciones ideales y con microscopistas entrenados, la gota gruesa puede detectar entre 5 y 50 parásitos/ μL de sangre periférica(61), lo que equivale a una sensibilidad teórica $> 90\%$ en infecciones con parasitemias medias-altas. Sin embargo, su sensibilidad cae drásticamente con parasitemias bajas (<100 parásitos/ μL).

Pruebas rápidas

Las pruebas rápidas disponibles en el mercado para el diagnóstico de la malaria se introdujeron en 2010 y desde entonces han mantenido su amplia utilización. Hasta hace unos años, se creía que estas pruebas tenían una sensibilidad superior en comparación con el diagnóstico microscópico (62). Sin embargo, investigaciones recientes han revelado una disminución en la sensibilidad de las pruebas rápidas dúo, llegando a un 80%, específicamente en la identificación de *P. falciparum*, atribuyéndole esta problemática a la presencia de deleciones en las proteínas objetivo HRP2 y HRP3, como resultado de la deleción de los genes *Pfhrp2* y *Pfhrp3*, además, se ha demostrado su poca eficiencia en casos de parasitemia menores a 500 parásitos por microlitro, disminuyendo marcadamente su sensibilidad; esta situación ha dado lugar a un aumento significativo en los casos de resultados falsos negativos, marcando una clara diferencia con *P. vivax*, que sigue manteniendo una sensibilidad del 100% en casos de parasitemia elevadas, sin embargo, cuando los pacientes presentan parasitemia bajas, se incurre en resultados de falsos negativos (8,11).

Esta problemática ha adquirido mayor relevancia en los últimos años, lo que ha llevado a las autoridades gubernamentales a desarrollar estrategias e informes para su seguimiento. Estas estrategias se basan en datos derivados de estudios enfocados en la identificación de deleciones de los genes *Pfhrp2* y *Pfhrp3* en parásitos de *P. falciparum*. La prevalencia y distribución de las cepas con deleciones, se muestra en la figura 5.

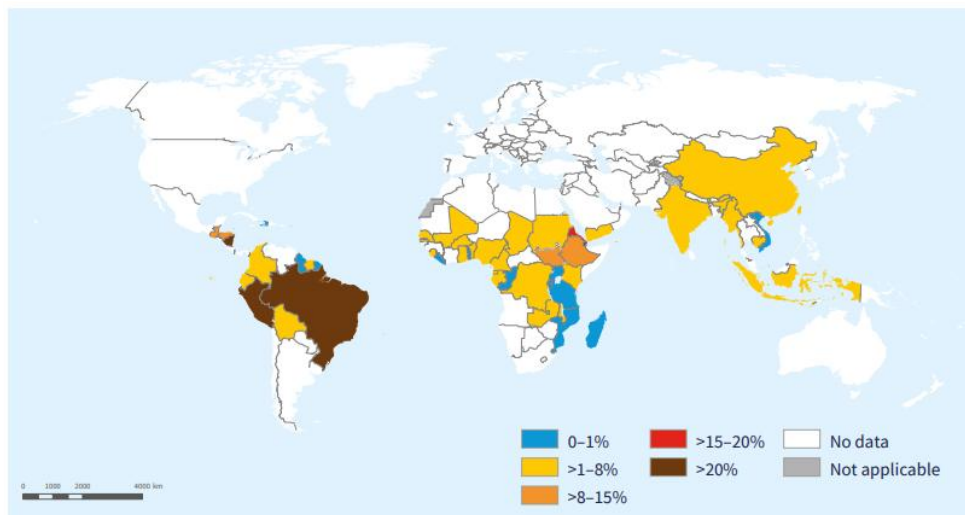


Figura 5. Prevalencia estimada de deleción del gen *Pfhrp2*, 1996–2023 Fuente: *Revisión de la literatura publicada incluida en el Mapa de Amenazas de Malaria Tomado de: World Malaria report 2024.* Geneva: World Health Organization; 2024. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Por otro lado, los resultados de estudios llevados a cabo en Colombia proporcionan datos relevantes acerca de la distribución geográfica de las cepas portadoras de estas mutaciones. Regiones como el Amazonas, Córdoba, Valle, Nariño y Guaviare han demostrado presentar deleción completa del gen *Pfhrp2* y *Pfhrp3*. Estos hallazgos respaldan los resultados obtenidos en evaluaciones de desempeño previas y ofrecen una visión más detallada de la situación en el país(10).

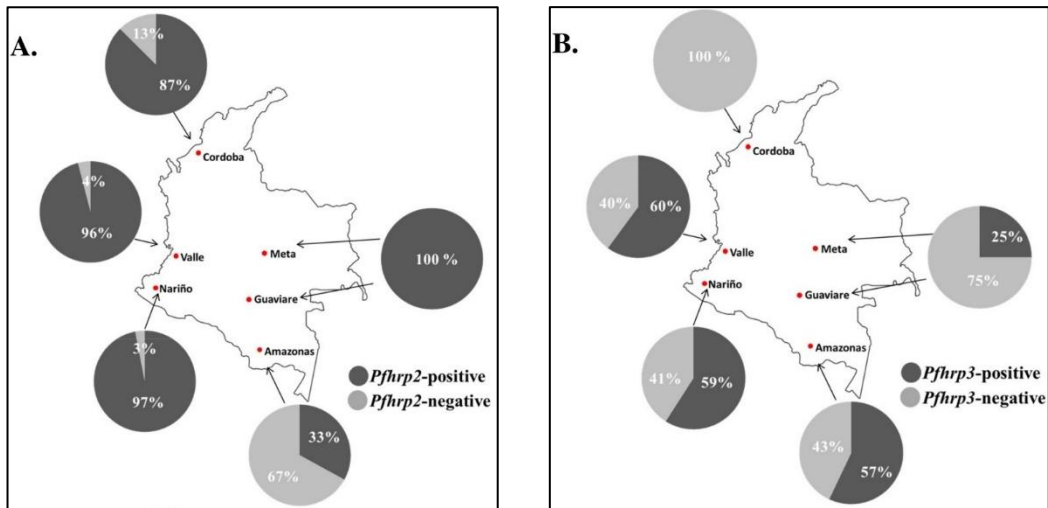


Figura 6. Prevalencia de deleciones de *Pfhrp2* y *Pfhrp3* de aislados de *P. falciparum* en Amazonas (N = 21), Córdoba (N = 16), Valle (N = 25), Nariño (N = 34) y Guaviare-Meta (N =4).

Tomado de: Solano CM et al. Deletion of *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 (*Pfhrp2*) and Histidine-Rich Protein 3 (*Pfhrp3*) Genes in Colombian Parasites. PLOS ONE. 7 de julio de 2015;10(7):e0131576.

Diagnóstico molecular

Los métodos moleculares sobrepasan la microscopía y las pruebas de inmunodiagnóstico en eficacia para detectar parasitemias, incluso en niveles muy bajos o en pacientes asintomáticos (63). En tales situaciones, donde la identificación precisa del parásito es crucial para el tratamiento adecuado, los métodos moleculares han demostrado su eficacia al detectar y diferenciar entre diversas especies de parásitos de malaria, incluidas aquellas menos comunes (64,65). Sin embargo, a pesar de sus ventajas, los métodos moleculares pueden no ser viables en áreas rurales o de difícil acceso debido a la infraestructura necesaria para los ensayos (66), además del alto costo de los insumos necesarios para llevarlos a cabo, lo que los coloca en desventaja frente a los métodos de detección microscópica o pruebas rápidas.

Tecnología SELEX

La metodología SELEX (Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial) fue desarrollada en 1990 por dos grupos de manera simultánea: Ellington y Szostak, y Tuerk y Gold, utilizando la tecnología de selección *in vitro*. Esta metodología se basa en la creación de bibliotecas de secuencias cortas de ácidos nucleicos que, a través de rondas de selección positiva y negativa, posibilitan la identificación de secuencias nucleotídicas con capacidad de unión a moléculas orgánicas pequeñas. Estas secuencias, denominadas aptámeros, derivan su nombre de la combinación de la raíz latina *aptus*, que significa "que encaja", y la raíz griega *mers*, que significa "molécula". Por ende, "aptámero" se interpreta como "molécula que encaja" tras el plegamiento de su estructura (67,68).

Para ello se requieren bibliotecas de oligonucleótidos que cuentan con cadenas sencillas de oligonucleótidos (ADN o ARN) de longitud corta, generalmente compuestos por entre 20 y 80 nucleótidos y con un peso molecular que oscila entre 6 y 30 kDa; además poseen una región altamente variable, que le permite adoptar estructuras 3D únicas, lo cual es fundamental para la unión a moléculas blanco. Los aptámeros poseen una elevada capacidad de unión con biomarcadores específicos a través de diversos mecanismos moleculares.

Esta afinidad se establece mediante interacciones electrostáticas con superficies diana que poseen una carga positiva. Además, los aptámeros pueden formar puentes de hidrógeno con grupos funcionales presentes en sus objetivos. Se ha observado que las interacciones hidrofóbicas entre las regiones complementarias de las moléculas también contribuyen significativamente a la unión. Asimismo, la unión se ve favorecida por interacciones estéricas, donde el aptámero se adapta a la estructura tridimensional del objetivo. Las interacciones iónicas entre grupos ácidos y básicos, así como los enlaces covalentes, también participan en este proceso de unión(69–71).

Variantes de la tecnología SELEX

A lo largo del tiempo, la metodología SELEX ha experimentado refinamientos y evoluciones significativas, incorporando nuevos diseños y estrategias metodológicas para la identificación de biomarcadores mediante el uso de aptámeros, sin desviarse de su principio fundamental. Entre estas innovaciones, se destacan los siguientes enfoques:

Cell- SELEX

Cell-SELEX, es una estrategia basada en la identificación de aptámeros capaces de reconocer biomarcadores presentes en la membrana celular o en superficies de células intactas(72). Este método se distingue notablemente del SELEX clásico, por su capacidad de reconocer blancos en su conformación nativa(73). Una de sus principales ventajas es que no se limita a la identificación de un único biomarcador, sino que puede generar aptámeros contra diversas biomoléculas simultáneamente, permitiendo incluso la discriminación entre tipos celulares con perfiles moleculares similares. Esta versatilidad ha sido demostrada en diversos estudios, como en la detección de células de leucemia linfoblástica aguda (ALL) mediante aptámeros seleccionados por Cell-SELEX(74), y en la identificación de biomarcadores específicos de células de cáncer de mama, pulmón y próstata(75).

In vivo SELEX

La metodología conocida como *in vivo* SELEX representa otro enfoque ampliamente utilizado en la identificación de aptámeros. Este método sigue la misma estructura que el SELEX tradicional, con la excepción del blanco seleccionado. En el *in vivo* SELEX, los aptámeros se introducen en el interior de un organismo vivo con el propósito de que reconozcan su blanco específico. Posteriormente, estos aptámeros son extraídos del organismo, amplificados y secuenciados para revelar la secuencia de este. Este método ha demostrado su eficacia al identificar aptámeros capaces de penetrar distintos tejidos, lo que subraya la viabilidad de generar aptámeros utilizando modelos animales vivos con condiciones o blancos específicos. La aplicación del *in vivo* SELEX no solo amplía el espectro de posibles aplicaciones de los aptámeros, sino que también proporciona una perspectiva única al permitir la identificación de moléculas objetivo-relevantes en entornos biológicos más complejos y fisiológicamente relevantes(76,77).

CE-SELEX

La técnica SELEX con Electroforesis Capilar (CE-SELEX) sigue el mismo principio fundamental que la metodología SELEX. Sin embargo, se distingue por emplear electroforesis capilar como método de separación, en lugar de depender de la inmovilización del blanco. Tras la incubación de la biblioteca de aptámeros con la molécula blanco, la mezcla se somete a electroforesis capilar, donde los aptámeros libres y los complejos aptámero-blanco se separan en función de su movilidad electroforética, la cual depende de su carga, tamaño y conformación(78,79). Esta técnica permite recuperar de forma eficiente los complejos que migran más lentamente, ya que han cambiado sus propiedades electroforéticas al unirse a su diana. CE-SELEX ofrece

varias ventajas, como mayor velocidad de selección, menor consumo de reactivos y la posibilidad de seleccionar aptámeros contra blancos en solución y en su conformación nativa(80).

Bio-SELEX

La metodología Bio-SELEX, se fundamenta en la identificación de aptámeros específicos, empleando muestras biológicas complejas. El proceso está formado por 3 pasos: SELEX tradicional, Pull Down e identificación de biomarcadores por espectrometría de masas, de acuerdo a lo propuesto por Ospina-Villa et al (81). A diferencia de otros métodos de selección, Bio-SELEX está diseñado para adaptarse a distintos tipos de muestras y condiciones experimentales, lo que lo convierte en una herramienta versátil para el descubrimiento de biomarcadores clínicamente relevantes. A continuación, se describe brevemente los procedimientos más comunes mediante los cuales puede implementarse esta metodología:

1. SELEX tradicional: se seleccionan aptámeros capaces de unirse a componentes presentes en una muestra biológica, como proteínas en un extracto celular o fluidos biológicos.
2. Ensayo de Pull-Down: los aptámeros seleccionados se utilizan como sondas para capturar sus dianas moleculares presentes en la muestra, permitiendo su aislamiento.
3. Identificación por espectrometría de masas: las proteínas unidas a los aptámeros se analizan por espectrometría de masas para identificar los posibles biomarcadores.

2.2 ESTADO DEL ARTE

Aptámeros contra *Plasmodium* spp.

En 2012, Seonhwan Lee *et al.* (Corea del Sur) identificaron aptámeros de ADN monocatenario, capaces de reconocer de forma específica la proteína lactato deshidrogenasa (PLDH) de *P. vivax* y *P. falciparum*, mediante la técnica SELEX. Estos aptámeros demostraron una alta selectividad y sensibilidad, al unirse eficientemente a sus respectivas proteínas diana. La caracterización de los aptámeros seleccionados se realizó utilizando diversas técnicas biofísicas, incluyendo ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA), microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), ensayos de fluorescencia y espectroscopía de dicroísmo circular.

Adicionalmente, el grupo desarrolló un aptasensor electroquímico basado en espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), que permitió la detección selectiva de PLDH de *P. vivax* y *P. falciparum* con un límite de detección de 1 pM. Este aptasensor fue capaz de distinguir claramente entre muestras de sangre infectadas con diferentes especies del parásito, incluso a través de diluciones seriadas con distintas concentraciones parasitarias. Los autores concluyeron que esta herramienta podría ser de gran utilidad para el diagnóstico, monitoreo y vigilancia epidemiológica de la malaria. No obstante, señalaron como limitación el número reducido de muestras analizadas, lo cual impidió validar completamente la robustez del aptámero bajo diferentes condiciones experimentales (82).

Posteriormente, en 2013, Cheung *et al.* desarrolló un aptámero utilizando la metodología SELEX, dirigido contra la proteína recombinante de lactato deshidrogenasa (PfLDH) de *P. falciparum*. El aptámero mostró alta especificidad y capacidad discriminativa frente al lactato deshidrogenasas humanas (LDH humanas). La caracterización de la interacción aptámero–proteína se realizó mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC), revelando una constante de disociación (Kd) de 42 nM. Además, mediante análisis estructural, se evidenció que el aptámero se une en forma de dímero a la proteína PfLDH, que presenta una conformación tetramérica. En etapas posteriores del estudio, se emplearon nanopartículas de oro para desarrollar un sistema de detección colorimétrica, capaz de diferenciar entre PfLDH y LDH humana, reforzando la especificidad del aptámero. La singularidad estructural del aptámero obtenido sugiere un alto potencial para guiar el diseño racional de nuevas sondas moleculares, con miras al desarrollo de pruebas diagnósticas más sensibles y específicas(83).

Seguidamente, En 2018, Anne Frith y su equipo desarrollaron dos aptámeros mediante la metodología SELEX, dirigidos específicamente contra la proteína recombinante rPfLDH y un oligopéptido específico de *P. falciparum* denominado LDHp. Durante el análisis de las secuencias obtenidas, se identificaron regiones altamente conservadas entre los aptámeros seleccionados en su estudio, destacándose la presencia de motivos como tramos poli-A, ATTAT, GGTAG y GGCG, algunos de los cuales ya habían sido reportados en trabajos previos. Este hallazgo sugiere que dichas secuencias podrían desempeñar un papel clave en el proceso de reconocimiento molecular del blanco proteico. A lo largo de la investigación, los autores sintetizaron diversos aptámeros dirigidos tanto contra proteínas recombinantes como contra proteínas endógenas del parásito. Como resultado, identificaron un aptámero denominado LDHp11, el cual demostró una alta capacidad de discriminación entre la lactato deshidrogenasa (LDH) de *P. falciparum* y la de *P. vivax*, evidenciando su potencial como herramienta de diagnóstico diferencial para infecciones por malaria(84).

En 2020, Lantero *et al.* aplicó la técnica Cell-SELEX para la identificación de aptámeros con la capacidad de reconocer glóbulos rojos infectados por *P. falciparum*. Como resultado, se identificaron cinco aptámeros funcionales, a los cuales se les eliminó la región flanqueante de los primers, conservando su capacidad de

discriminar entre glóbulos rojos infectados y no infectados. El análisis estructural reveló una notable presencia de guaninas en la estructura, indicativa de la formación de G- El análisis estructural de los aptámeros reveló una alta proporción de residuos de guanina, lo que sugiere la formación de estructuras tipo G-cuádruplex, conocidas por su estabilidad y especificidad de unión. Estos aptámeros mostraron afinidad por marcadores intracelulares en eritrocitos previamente permeabilizados, y su eficacia fue superior en más de 30 veces respecto al aptámero desarrollado por Cheung et al. en 2013. Entre los aptámeros identificados, el denominado 30s destacó inicialmente por su capacidad para reconocer específicamente las etapas de trofozoíto y esquizonte de *P. falciparum*. Sin embargo, los ensayos de especificidad revelaron reacciones cruzadas con otras especies del género *Plasmodium*. Por esta razón, los autores propusieron su uso como base para el desarrollo de una prueba diagnóstica pan-específica para *Plasmodium* spp(85).

Aplicaciones diagnósticas

En 2013, Weejeong Jeon Et a. idearon una técnica diagnóstica basada en la interacción entre la proteína LDH de *Plasmodium* spp. y el aptámero PL1, específicamente diseñado para detectar la proteína lactato deshidrogenasa (LDH) de *P. vivax* y *P. falciparum*. Este enfoque novedoso incluyó la utilización de polímeros catiónicos que, al interactuar con la LDH, generaron un cambio de color observable, pasando de rojo a azul. La intensidad del viraje de color fue directamente proporcional a la concentración de PLDH, proporcionando así un método visual y fácilmente interpretable para la detección de la presencia de estas especies de *Plasmodium*(86).

En el año 2015, Tanner y colaboradores patentaron una invención que involucra aptámeros específicos. Utilizando la metodología SELEX, lograron identificar aptámeros que se unen a lactato deshidrogenasa (LDH) de *Plasmodium* spp. y a PfHRP2, una proteína exclusiva de *P. falciparum*. Estos aptámeros fueron posteriormente acoplados a partículas de oro coloidal con el propósito de facilitar su aplicación en el diagnóstico de muestras humanas (87). Esta patente representa un avance significativo en el desarrollo de herramientas diagnósticas para la detección de la malaria, al utilizar aptámeros altamente selectivos para componentes específicos de *Plasmodium* spp. La conjugación de estos aptámeros con oro coloidal sugiere una aplicación prometedora en sistemas de detección que buscan mejorar la sensibilidad y la especificidad en el diagnóstico de infecciones por *Plasmodium* spp., con un enfoque particular en la especie *P. falciparum*.

En el año 2015, Roderick reportó el diagnóstico rápido de malaria mediante captura de enzima ligada a aptámero (APTEC), mediante la cual un aptámero captura el biomarcador lactato deshidrogenasa de *P. falciparum* (PfLDH) y luego la actividad se mide colorimétricamente. La prueba sensible robusta(límite de detección = 4,9 ng/ml) y pudo diagnosticar de manera confiable la malaria en muestras clínicas de sangre(88).

En 2016, Dirkzawager llevó a cabo la adaptación de un ensayo que captura enzimas ligadas a aptámeros, explorando su potencial para el diagnóstico de la malaria. Este ensayo permitió la detección de PfLDH en las muestras al utilizar su actividad enzimática para producir un cambio de color azul visible en caso de resultados positivos. Mediante la utilización de impresiones tridimensionales de prototipos rápidos, se desarrollaron dos tipos de pruebas: una de jeringa de papel y otra de pozo basada en perlas magnéticas. Ambas pruebas demostraron con éxito la capacidad de detectar PfLDH recombinante. Este avance se logró mediante el uso de la metodología SELEX y aptámeros previamente identificados. Esta innovadora tecnología, diseñada para pruebas rápidas de diagnóstico de malaria, es única y ofrece numerosas ventajas potenciales en comparación con los métodos inmunocromatográficos de flujo lateral convencionales(89).

En el año 2018, Faser L et al. reportó el desarrollo de un biosensor de malaria, mediante el cual los aptámeros son adheridos a perlas magnéticas para la captura, lavado y detección del biomarcador guiado por imanes, a

través de virajes colorimétricos, debido a una reacción de oxido reducción, generada por la interacción entre la enzima LDH de *Plasmodium* y el reactivo cromogénico MePMS empleado. Optimizaron una serie de prototipos de biosensores de microfluidos para reducir las tasas de difusión entre cámaras, aumentar la sensibilidad y proporcionar un método para pruebas de muestras en el lugar de atención. El biosensor mostró una alta sensibilidad y especificidad al detectar PfLDH utilizando muestras de parásitos cultivadas *in vitro* y muestras clínicas de pacientes con malaria. El alto rendimiento del biosensor proporciona una prueba de principio para un biosensor portátil que podría adaptarse a una variedad de escenarios de diagnóstico mediados por aptámeros(90).

En 2019, Diego F et al. propusieron una estrategia innovadora para superar las limitaciones inherentes a los métodos tradicionales de diagnóstico de la malaria, los cuales dependen en gran medida de complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). En lugar de estos enfoques convencionales, los investigadores recurrieron al análisis de bases de datos de expresión génica, perfiles ribosomales y modelos estructurales, con el objetivo de identificar blancos moleculares más estables y representativos del ciclo de vida del parásito. Mediante la aplicación de la metodología SELEX, lograron seleccionar aptámeros de ADN con alta afinidad por la proteína recombinante *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) de *P. falciparum*, conocida por su alta estabilidad durante todas las etapas del ciclo intraeritrocítico. Los experimentos demostraron que la interacción aptámero-PfHMGB1 se producía en cuestión de segundos. Además, los análisis de especificidad revelaron que la unión del aptámero a la HMGB1 de *P. falciparum*, en contraste con su homólogo humano, estaba influenciada por el pH del medio, lo que refuerza la idea de que puede explotarse esta diferencia para mejorar la selectividad en entornos fisiológicos. En conjunto, los hallazgos posicionan a PfHMGB1 como un biomarcador prometedor para el diseño de nuevas pruebas diagnósticas específicas para la malaria causada por *P. falciparum*(91).

En 2019, Kumar y colaboradores introdujeron una técnica innovadora basada en papel para la detección de biomarcadores mediante colorantes catalizados por las enzimas lactato deshidrogenasa de *Plasmodium* (PLDH) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *P. falciparum* (PfGDH). En este enfoque, se emplearon aptámeros específicos para estas dos proteínas, los cuales fueron acoplados a enzimas. Esta estrategia permitió la detección cualitativa y cuantitativa de biomarcadores mediante la observación del cambio de color y la intensidad de los píxeles en la superficie del papel, respectivamente(92).

En el año 2021, Figueroa-Miranda et al. desarrollaron una matriz de electrodos múltiples (Flex-Mea) diseñadas como aptasensores electroquímicos multiplexado para el diagnóstico de malaria. El cual posee 4 receptores de aptámeros diferentes, descritos previamente por discriminando entre infección por *P. falciparum* y *P. vivax*, mediante la proteína LDH de *Plasmodium* spp, empleando el aptámero 2008s (PfLDH) aptámero PL1 (LDH de *P. falciparum* y *P. vivax*), aptámero LDHp11, altamente selectivo de PfLDH y el aptámero 2106s que detecta la previamente descrito y el aptámero (2106s) PfHRP2 exclusiva de *P. falciparum*. Mostrando una sensibilidad de >75% para parasitemia de 0,001%, lo que equivale a 50 parásitos/ μ l y una discriminación de ambas enfermedades. Sin embargo, un análisis de costos corroboró aún más la aplicabilidad de este Aptasensor de múltiples objetivos como pruebas rápidas en lugares de atención remotas(93).

En 2021, Young Lo et al. diseñaron una estrategia de detección electroquímica basada en aptámeros para la proteína rica en histidina 2 de *P. falciparum* (PfHRP2). Mediante la metodología SELEX, seleccionaron un aptámero de ADN altamente específico que, tras ser funcionalizado con azul de metileno y anclado a un electrodo de oro, permitió la cuantificación de PfHRP2 en suero humano con un límite de detección (LOD) de 3,73 nM. El biosensor mostró buena estabilidad en tampón con suero y pudo reutilizarse en varias rondas de medición sin pérdida significativa de señal(94). No obstante, la utilidad clínica de esta plataforma puede verse

comprometida por la presencia de deleciones en el gen *Pfhrp2*, cada vez más frecuentes en ciertas regiones endémicas, lo que subraya la necesidad de considerar la variabilidad genética del blanco al diseñar dispositivos de detección basados en aptámeros.

En el año 2022, el equipo de investigación liderado por Roca et al. logró identificar un aptámero denominado D10 a través de la metodología SELEX, el cual demostró una afinidad notable por la enzima 1-Deoxy-D-xylulose-5-fosfato-reductoisomerasa (DXR). Esta enzima desempeña un papel crucial como la segunda etapa en la ruta metabólica del metil-eritritol-fosfato (MEP), esencial para la biosíntesis de isoprenoides, y resulta vital para la supervivencia del parásito. Durante el proceso experimental, los investigadores emplearon aptámeros acoplados a fluoróforos, los cuales fueron incubados con cultivos *in vitro* de *P. falciparum*. Este enfoque reveló la capacidad de los aptámeros para fijarse de manera específica en el orgánulo apicoplasto, donde se localiza la vía MEP. Este resultado posiciona al aptámero D10 como un marcador altamente específico para glóbulos rojos parasitados en comparación con los glóbulos rojos sanos(95).

En el año 2022, Ogunmolasuyi y su equipo llevaron a cabo el desarrollo de un dispositivo analítico de papel de microfluidos, utilizando aptámeros previamente documentados por Cheing et al. y Frith K-A et al., específicos para *P. falciparum* y *P. vivax*, respectivamente. Estos aptámeros, acoplados al complejo Biotina/Estreptavidina, fueron hábilmente inmovilizados en papel de cromatografía Whatman. Dichos aptámeros demostraron una afinidad selectiva hacia la proteína recombinante de PfLDH. Los resultados revelaron que los aptámeros *rLDH7* y 2008 fueron capaces de reconocer de manera efectiva la proteína PfLDH. Este dispositivo exhibió un límite de detección impresionante de 11 nM en soluciones tamponadas de la proteína y 17 nM en muestras de suero o glóbulos rojos lisados. Estos hallazgos destacan la eficacia y sensibilidad de la plataforma, subrayando su potencial utilidad en aplicaciones diagnósticas para la detección de malaria, al tiempo que demuestran la versatilidad de los aptámeros en el diseño de dispositivos analíticos innovadores(96).

Aplicaciones terapéuticas

En 2009, Bradford et al. emplearon la metodología SELEX para aislar aptámeros capaces de unirse a la proteína de membrana eritrocitaria 1 de *P. falciparum* (PfEMP1) directamente en células vivas. Los aptámeros seleccionados demostraron interrumpir eficazmente las rosetas formadas por eritrocitos infectados, un fenómeno asociado a la patogenicidad de la malaria grave. Estos hallazgos posicionan a los aptámeros como candidatos prometedores para terapias complementarias, al dirigirse de manera específica a determinantes clave del parásito *in situ*. El estudio subraya, por tanto, el potencial de los aptámeros como herramientas terapéuticas innovadoras para bloquear interacciones celulares críticas durante la infección por *P. falciparum* y abrir nuevas vías en el tratamiento de la malaria severa(97).

En el año 2023 Ospina-Villa et al. publicaron el desarrollo de una nueva variante de la metodología SELEX, que permite la identificación de biomarcadores, partiendo de muestras biológicas, a la cual denominó Bio-SELEX(81). En el mismo año, Morales et al. empleando la metodología Bio-SELEX, identificó el aptámero CH1, capaz de reconocer la presencia de la subunidad alfa ATPasa de *T. cruzi* circulando en muestras de suero de pacientes con EC en fase crónica(98).

Aptámeros vs. Anticuerpos

A continuación, se comparan las principales propiedades fisicoquímicas, los requerimientos de producción y el desempeño de aptámeros y anticuerpos monoclonales empleados en plataformas de diagnóstico. Esta síntesis permite contextualizar la relevancia de los aptámeros frente a los anticuerpos tradicionales, resaltando sus diferencias en afinidad, especificidad, facilidad de producción y rendimiento.

Tabla 1. Comparación de aptámeros y anticuerpos monoclonales empleados en plataformas de diagnóstico. Datos compilados de las referencias.

Propiedad	Aptámeros	Anticuerpos	Comentario técnico	Referencia
Afinidad típica (Kd)*	10 pM – 100 nM (rango habitual; < 1 nM con optimización)	50 pM – 10 nM (IgG monoclonales de alta afinidad)	Ambos alcanzan afinidades nanomolares; los aptámeros pueden mejorarse por evolución in vitro adicional (“maturation SELEX”).	(99)
Especificidad / discriminación alélica	Alta; bases pareadas permiten distinguir variantes con 1-2 mutaciones	Alta, pero a veces reactividad cruzada con isoformas estructuralmente próximas	Aptámeros pueden programarse para diferenciar epítomos lineales de pocos átomos.	(100)
Costo de producción	5 – 15 USD · mg ⁻¹ (síntesis química, lotes ≥ 10 mg)	150 – 300 USD · mg ⁻¹ (cultivo celular, purificación IgG grado diagnóstico)	El escalado de aptámeros es más barato porque no requiere biorreactores ni cromatografía de afinidad.	(101,102)
Tiempo de obtención	4 – 8 semanas (SELEX + síntesis)	4 – 6 meses (inmunización, hibridomas, clonaje, expansión)	Aplazable a 2-3 semanas con SELEX microfluídico.	(103)
Estabilidad térmica	Funcional hasta 85-95 °C (dependiente de Mg ²⁺); puede renaturalizarse tras desnaturalización	Desnaturalización irreversible > 60 °C; pérdida de actividad	Ventaja clave para kits en regiones tropicales.	(104)
Rango de pH operativo	2 – 11 (dependiendo de modificaciones)	6 – 8 (la mayoría pierde afinidad fuera de isotonicidad)	Permite ensayos en matrices ácidas/básicas (orina, jugos gástricos).	(105)
Tamaño molecular	5 – 25 kDa (20-100 nt)	~150 kDa (IgG); ~25 kDa (VHH)	Aptámeros penetran microambientes densos y sitios enzimáticos estrechos.	(106)

Inmunogenicidad	Nula o muy baja (modificable con 2'-F, 2'-OMe)	Puede inducir respuesta anti-IgG; riesgo de inmunorreactividad	Ventaja para aplicaciones <i>in vivo</i> repetidas.
Modificaciones químicas	Fáciles: LNA, 2'-F-RNA, Spiegelmers (L-RNA)	Limitadas (glicosilación, PEGilación)	Permite ajustar afinidad, vida media, resistencia a nucleasas. (107)
Mecanismos de plegamiento	G-quadruplex, pseudonudos, tallo-bucle, triples hélices; confieren sitios de unión específicos	Regiones CDR (lazos β) dentro de dominios IgG	La diversidad estructural de aptámeros surge de espaciado iónico y bases apiladas, no de cadenas laterales de aminoácidos. (108)

2.3 Marco legal

La lucha contra la malaria en Colombia se enmarca en un conjunto de disposiciones legales que delimitan estrategias para un diagnóstico oportuno y eficaz de esta enfermedad. En el ámbito de la investigación académica, estas regulaciones constituyen un cimiento sólido para la comprensión y el análisis del tema. A continuación, se presenta un examen detallado del marco legal vigente.

En primer lugar, la Constitución Política de Colombia de 1991 sienta las bases del derecho fundamental a la salud, otorgando al Estado la responsabilidad de garantizar este derecho y fomentar la investigación científica para su mejoramiento. Esta disposición constitucional proporciona el cimiento sobre el cual se desarrollan las políticas públicas en materia de salud, incluyendo aquellas relacionadas con el diagnóstico de la malaria. La Ley 100 de 1993 y el Decreto 2266 de 1993 establecen el Sistema General de Seguridad Social en Salud (SGSSS), el cual define los servicios de salud que deben ser prestados a los ciudadanos, incluyendo el diagnóstico y tratamiento de la malaria. Estas disposiciones son complementadas por el Decreto 2124 de 1992, el cual reglamenta el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SINVSP), estableciendo las obligaciones de las entidades del sector salud en materia de vigilancia epidemiológica, esencial para un diagnóstico oportuno de la malaria.

En Colombia, el marco político que soporta esta iniciativa estratégica es el Plan Decenal de Salud Pública 2012-2021, el cual en su dimensión de enfermedades transmisibles define las metas del subprograma de malaria. Estas incluyen la reducción de la morbilidad en un 40%, disminución de la mortalidad en un 80% y la eliminación de la malaria urbana/ periurbana en municipios prioritarios. El modelo para la gestión de la respuesta técnica y operativa requerida para alcanzar estas metas es la Estrategia de Gestión Integrada para la Promoción, Prevención, Vigilancia y Control de las ETV 2012-2021(109). Por otro lado, la Resolución 4202 de 2007 y la Resolución 3404 de 2009 detallan los lineamientos técnicos y administrativos para la vigilancia y manejo de la malaria en Colombia, incluyendo la clasificación de casos y el tratamiento correspondiente. Estas normativas aseguran una atención integral y eficaz a los pacientes diagnosticados con malaria. La Ley 1122 de 2008 y el Decreto 780 de 2016, junto con el Plan Nacional de Control y Eliminación de la Malaria 2016-2020, establecen objetivos claros y estrategias específicas para el control y eliminación de la malaria en el país. Estos instrumentos legales proporcionan un marco de acción coordinado y efectivo para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad(110,111). Finalmente, los Lineamientos Técnicos para el Diagnóstico y Manejo de la Malaria en Colombia, emitidos en 2023, actualizan las recomendaciones para el diagnóstico y manejo de la enfermedad, asegurando que se utilicen las últimas prácticas y tecnologías disponibles.

Algoritmo diagnóstico de malaria

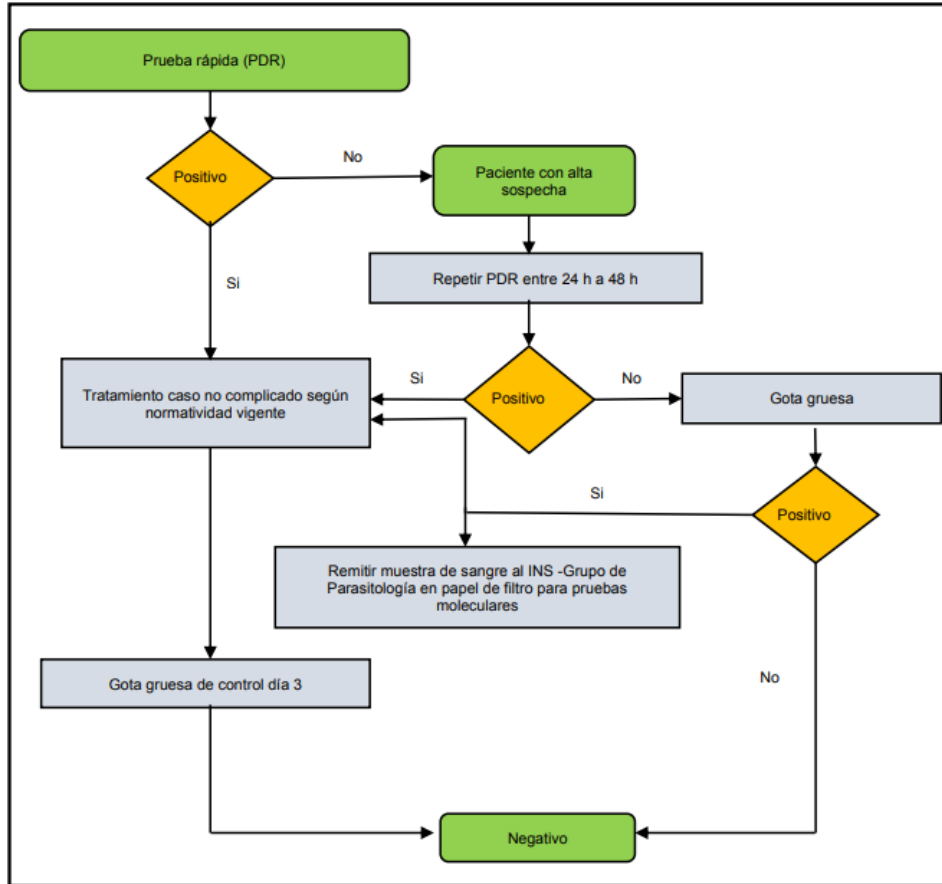


Figura 1. Algoritmo de decisión para la atención del paciente con malaria

Figura 7. Algoritmo de decisión para la atención del paciente con Malaria

Tomado de: Instituto Nacional de Salud- INS. Recomendación técnica sobre el diagnóstico y seguimiento al tratamiento de malaria por gota gruesa y pruebas rápidas y uso de pruebas diagnósticas moleculares en la detección de *Plasmodium* spp. en Colombia (112).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar biomarcadores con potencial diagnóstico para malaria por *P. falciparum* y *P. vivax*, mediante la aplicación de la estrategia Bio-SELEX en cepas colombianas.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Describir los patrones sociodemográficos y epidemiológicos de la población incluida en el estudio de biomarcadores para malaria en municipios de Chocó, Colombia.
- ✓ Seleccionar e identificar aptámeros específicos de *P. vivax* y *P. falciparum*.
- ✓ Evaluar la capacidad de los aptámeros seleccionados para reconocer potenciales blancos en muestras clínicas de pacientes infectados con *P. vivax* y *P. falciparum*.

4. METODOLOGÍA

4.1 Diseño y enfoque metodológico de la investigación

Este estudio se desarrolló bajo un enfoque cuantitativo, con base en la formulación de objetivos claros, la definición precisa de las variables y la utilización de escalas de medición adecuadas para cada una de ellas. Se establecieron criterios específicos para la selección de la población de estudio y se aplicaron métodos estadísticos descriptivos para el análisis de los datos obtenidos. La estructura metodológica se sustentó en una revisión exhaustiva de la literatura científica actual sobre malaria y aptámeros, lo que permitió construir un marco teórico sólido y guiar el desarrollo de cada una de las fases de la investigación. Este enfoque cuantitativo resulta especialmente útil en estudios de validación de biomarcadores, dado que permite estimar con precisión la frecuencia, distribución y características de las variables clínicas, moleculares y epidemiológicas evaluadas.

4.2 Tipo de estudio

Este es un estudio observacional, descriptivo, exploratorio y transversal cuyo objetivo fue identificar biomarcadores potenciales para el diagnóstico de malaria a partir de muestras clínicas, mediante estrategias basadas en aptámeros y análisis bioinformático-estructural. La naturaleza observacional del estudio radica en que no se manipuló intencionalmente ninguna variable, sino que se analizaron características biológicas y clínicas ya presentes en la población participante.

Dado que se trata de una etapa exploratoria enfocada en la identificación preliminar de blancos moleculares, no se realizó un cálculo de tamaño muestral a priori. No obstante, los hallazgos obtenidos sientan las bases para el diseño de futuras investigaciones analíticas o experimentales, en las que será necesario estimar un tamaño muestral apropiado para asegurar la validez estadística y la generalización de los resultados.

4.3 Población y muestra

Población de estudio

La población del estudio fue seleccionada por conveniencia y estuvo conformada por individuos con diagnóstico presuntivo de malaria, atendidos en instituciones de salud de municipios del departamento de Chocó, Colombia. Se incluyeron 38 individuos con diagnóstico presuntivo de infecciones por *P. falciparum* o *P. vivax*, según lo determinado por microscopía y/o pruebas rápidas. La recolección de muestras se realizó durante el periodo comprendido entre marzo y agosto de 2024. Adicionalmente, se incluyeron 10 participantes procedentes de diferentes zonas del Valle de Aburrá, en el departamento de Antioquia.

Los criterios de inclusión consistieron en: (i) diagnóstico presuntivo de malaria; (ii) edad mayor de cinco años; (iii) disposición voluntaria a participar; y (iv) firma del consentimiento informado por parte del paciente o su acudiente legal. Por el contrario, se excluyeron (i) pacientes coinfectados con otros agentes patógenos; (ii) personas con enfermedades crónicas descompensadas; (iii) individuos que estuvieran recibiendo tratamiento antimalárico previo a la toma de muestra; y (iv) casos con muestras hemolizadas o de baja calidad.

Todas las personas participantes firmaron un consentimiento informado previo a la toma de muestras, conforme a los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki. El protocolo fue aprobado por el comité de ética institucional del ICMT bajo el acta 91-2024, garantizando la confidencialidad, el uso responsable de la información y el cumplimiento de las normas bioéticas vigentes en Colombia.

4.4 Recolección de datos y muestras

4.4.1 Fuentes de Información

La recopilación de datos se basó en fuentes primarias, a partir de las cuales se obtuvo información sociodemográfica, epidemiológica y clínica de los participantes incluidos en este estudio. Esta información fue recolectada mediante formularios estandarizados, diligenciados en el momento de la toma de muestras y complementados con registros institucionales. Adicionalmente, se incluyeron, como fuente primaria, los datos derivados de los ensayos y experimentos desarrollados por los investigadores durante las distintas fases del proyecto, incluyendo los resultados de técnicas moleculares, pruebas de afinidad, ensayos Pull-Down y análisis bioinformáticos. Esta estrategia integral permitió obtener información precisa y pertinente, esencial para el análisis posterior y para la formulación de conclusiones válidas dentro del marco del estudio.

4.4.2 Técnicas e Instrumentos de recolección

El estudio se desarrolló bajo un diseño cualitativo de tipo observacional, empleando como instrumento principal una encuesta estructurada destinada a recopilar variables sociodemográficas y clínicas de los participantes, con el propósito de caracterizar integralmente la cohorte.

La captación de sujetos se realizó en los servicios de laboratorio de diferentes municipios del departamento del Chocó. Todos los participantes otorgaron su consentimiento informado o asentimiento, en el caso de menores de edad, mediante un formato avalado por el Comité de Ética en Investigación Biomédica de la Universidad CES (Acta 91-2024; 18 abr 2024). Un profesional entrenado garantizó la comprensión, la voluntariedad y la confidencialidad de la participación. Posteriormente, se aplicó el cuestionario y se efectuó la toma de muestras biológicas, las cuales se preservaron bajo cadena de frío y se trasladaron al laboratorio de referencia para su posterior procesamiento analítico. Durante todo el flujo de trabajo, las muestras se anonimizaron mediante códigos alfanuméricos, y la base de datos se almacenó en un servidor seguro, cumpliendo la Ley 1581 de 2012 sobre protección de datos personales. En la fase experimental, se empleó además una bitácora de laboratorio como instrumento secundario de recolección, donde se registraron los protocolos aplicados, las condiciones experimentales y los resultados obtenidos, asegurando la trazabilidad y el rigor técnico de cada procedimiento.

Todos los procedimientos y formatos utilizados: encuesta, consentimiento informado y asentimiento, se encuentran descritos en los Anexos 1, 2 y 3, respectivamente.

Recolección y procesamiento de muestras clínicas fase I

En la primera fase del estudio se recolectaron 48 muestras de sangre en total. De estas, 38 procedían de centros de salud ubicados en diferentes municipios del departamento del Chocó: Cértegui (4), Cantón de San Pablo (12), Condoto (5), Río Iró (5) y Las Ánimas (12). Las 10 muestras restantes fueron obtenidas de personas residentes en el área urbana del Valle de Aburrá.

Las muestras clínicas recolectadas incluyeron sangre, obtenida mediante procedimientos estándar. Se extrajo sangre total por venopunción del pliegue del antebrazo, recolectada en dos tipos de tubos: (i) tubos con tapa amarilla, que contienen gel separador y activador de la coagulación, empleados para la obtención de suero; y (ii) tubos con EDTA como anticoagulante, utilizados para conservar sangre total con fines analíticos. Además, se realizó una punción capilar en la yema del dedo de cada participante para la elaboración de la prueba de gota gruesa, conforme a las directrices del Programa Nacional de Control de la Malaria. Posteriormente, todas

las muestras fueron almacenadas en refrigeración (4 °C) y transportadas bajo condiciones de cadena de frío al laboratorio del Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT), donde se realizó su procesamiento inicial.

Análisis de datos para la caracterización sociodemográfica

Para el procesamiento de la información, se construyó una base de datos en Microsoft Excel (versión 2504), donde se realizó la depuración inicial de los registros. Este proceso incluyó la revisión de valores atípicos y ausentes, la codificación de variables y la estructuración ordenada de la matriz de datos. El análisis estadístico descriptivo fue realizado utilizando el software Jamovi (versión 2.6.17), a través del cálculo de frecuencias absolutas y relativas, así como medidas de tendencia central, según la naturaleza de cada variable.

Las tablas y los gráficos de barras utilizados en la presentación de los resultados fueron elaborados en Microsoft Excel, permitiendo una visualización clara de la información procesada. Este análisis permitió caracterizar la población del estudio con base en variables sociodemográficas clave, en concordancia con los objetivos planteados.

Selección y clasificación de las muestras biológicas

Después de la recolección de las muestras, se procedió a su procesamiento y análisis en el laboratorio, siguiendo los protocolos establecidos para cada técnica diagnóstica. Cada tipo de muestra fue destinada a una técnica específica: la sangre con EDTA y suero se utilizaron para la prueba rápida inmunocromatográfica y para la extracción de proteínas totales; y la sangre capilar se usó para la preparación de extendidos por gota gruesa y su posterior análisis microscópico.

Prueba rápida de malaria Bioline™ Malaria Ag P.f/P.v

Todas las muestras fueron evaluadas mediante una prueba inmunocromatográfica rápida para la detección de antígenos específicos de *Plasmodium* spp., para ello se utilizó el kit Bioline™ Malaria Ag P.f/P.v, el cual permite la identificación cualitativa y diferencial de *P. falciparum* y *P. vivax* a partir de sangre total.

El procedimiento se realizó conforme a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se depositó una gota de sangre total directamente en el pocillo de muestra del dispositivo de prueba y se añadieron tres gotas del diluyente suministrado. La reacción se incubó a temperatura ambiente, y los resultados se interpretaron a los 15 minutos. La lectura se efectuó de forma visual, siguiendo las indicaciones del inserto del fabricante. Solo se consideraron válidas aquellas pruebas en las que se evidenció adecuadamente la aparición de la línea de control. Ver anexo 5.

Prueba rápida de dengue SD BIOLINE Dengue Duo (IgG/IgM y NS1)

Se utilizó el kit SD BIOLINE Dengue Duo (Standard Diagnostics, Inc.), el cual permite la detección simultánea del antígeno NS1 y de anticuerpos IgM/IgG en muestras de sangre total, suero o plasma. El procedimiento se llevó a cabo conforme a las instrucciones del fabricante. Para la detección del antígeno y los anticuerpos, se aplicó una gota de sangre total en los pocillos correspondientes del dispositivo, seguida de la adición del diluyente provisto en el kit. Las pruebas se mantuvieron a temperatura ambiente durante la incubación, y la lectura de los resultados se realizó visualmente a los 15 minutos. La interpretación se basó en la presencia de bandas coloreadas en las regiones de prueba (NS1, IgM, IgG), junto con la línea de control (C), según lo especificado por el fabricante. Solo se consideraron válidas aquellas pruebas en las que se evidenció correctamente la línea de control. Ver anexo 5.

Microscopía con tinción de Field

El diagnóstico microscópico de malaria se realizó mediante la técnica de gota gruesa con tinción de Field. Brevemente, se colocó una gota de sangre total obtenida por punción digital sobre un portaobjetos limpio y se extendió hasta alcanzar un diámetro aproximado de 1 cm. Una vez seca, se aplicaron cinco gotas de azul de metileno fosfatado (Albor, Colombia) durante 5 segundos. Posteriormente, el extendido se tiñó durante 10 segundos con una mezcla recién preparada compuesta por 3 mL de tampón fosfatado, una gota de solución A (eosina) y una gota de solución B (azul de metileno), todos suministrados por Albor (Colombia). Las láminas se enjuagaron con agua destilada, se dejaron secar al aire y fueron examinadas mediante microscopía óptica. La identificación de especies se realizó con base en las características morfológicas de los parásitos observados en los diferentes estadios intraeritrocitarios, según los criterios establecidos en el Manual de Diagnóstico de Malaria del Instituto Nacional de Salud (INS) de Colombia. *P. falciparum* se reconoció por la presencia predominante de trofozoítos jóvenes en forma de anillo, citoplasma delgado y cromatina delicada; en algunas láminas también se observaron gametocitos en forma de medialuna o banano, característicos de esta especie. En contraste, *P. vivax* se identificó por la presencia de trofozoítos grandes y ameboides, eritrocitos aumentados de tamaño con punteado de Schüffner, esquizontes y gametocitos redondeados que ocupan gran parte del eritrocito(112).

Detección molecular del género *Plasmodium* spp.

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de sangre total anticoagulada con EDTA, utilizando un protocolo basado en lisis celular con proteinasa K, tratamiento con RNasa A, desproteinización con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y precipitación con etanol, conforme a procedimientos descritos por Sambrook & Russell (2001) para la obtención de ADN de alta calidad a partir de muestras clínicas. En resumen, se mezclaron 300 μ L de sangre con 300 μ L de solución de lisis, que contiene fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), seguido de agitación por vortex durante 10 seg. Luego se añadieron 5 μ L de proteinasa K (20 mg/mL) y 10 μ L de RNasa A, incubándose a 55 °C durante 1 hora en bloque seco. Posteriormente, se agregaron 600 μ L de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), se agitó vigorosamente durante 20 segundos y se centrifugó a 13 500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa resultante fue transferida a un nuevo tubo, a la cual se añadieron 150 μ L de acetato de sodio 3 M y 750 μ L de etanol absoluto. La mezcla se incubó a -20 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 13 500 rpm por 30 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados del pellet con 150 μ L de etanol al 70%, con centrifugación de 2 minutos entre cada lavado. La concentración y pureza del ADN extraído se evaluaron mediante espectrofotometría (NanoDrop™, Thermo Fisher Scientific), considerando como valores óptimos una relación 260/280 entre 1.8 y 2.0, y 260/230 mayores a 1.8. Para verificar la integridad del ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% preparado en buffer TBE 1X. Se añadieron 2 μ L del agente de tinción *HydraGreen™ Safe DNA Dye* a la mezcla del gel, el cual fue vertido en una cámara con peine de 14 pozos. Se cargaron 10 μ L del ADN extraído por muestra, junto con 2 μ L de buffer de carga Loading Dye azul 6X (SMOBIO, Cat. No. TP1110) y 2 μ L del marcador de peso molecular *Thermo Scientific™ GeneRuler 50 bp DNA Ladder* (Cat. No. SM0371). La electroforesis se llevó a cabo a 80 V durante 60 minutos en buffer TBE 1X, y el gel fue visualizado posteriormente en un transiluminador a 365 nm utilizando el sistema de documentación de geles Labnet ENDURO™ GDS (Model # GDS2-1365).

Se empleó una PCR anidada dirigida al gen del ARN ribosomal 18S, siguiendo el protocolo descrito por Snounou et al. (1993), con adaptaciones menores. Brevemente, la reacción se llevó a cabo en un volumen final

de 25 µL, utilizando el reactivo comercial OneTaq® 2X Máster Mix with Standard Buffer (New England Biolabs, Cat. No. M0482S). A cada mezcla se añadieron 12,5 µL del Máster Mix, 9,5 µL de agua libre de nucleasas, 1 µL de cebador forward rPLU5 (5'-CCTGTTGTTGCCTTAACTTC-3'), 1 µL de cebador reverse rPLU6 (5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3'), y 2 µL de ADN genómico extraído. La amplificación se realizó en un termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad), siguiendo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos; 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 58 °C por 1 minuto y extensión a 72 °C por 2 minutos; con una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, preparado en tampón TBE 1X, al que se añadió 2 µL del agente de tinción HydraGreen™ Safe DNA Dye (Intas Science). El gel fue vertido en cámara horizontal con peine y, una vez solidificado, se cargaron 10 µL del producto PCR por muestra mezclados con 2 µL de buffer de carga. Como referencia molecular se empleó el marcador GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific™, Cat. No. SM0371), cargando 2 µl por pozo. La electroforesis se realizó a 80 V durante 60 minutos en tampón TBE 1X, y la visualización se llevó a cabo en un transiluminador UV. La aparición de una banda de aproximadamente 1.6 kilobases (kb) fue interpretada como indicativa de la presencia del ARN ribosomal 18S de Plasmodium en la muestra analizada. Ver anexo 6.

Criterio diagnóstico

Una vez aplicadas las tres técnicas diagnósticas, microscopía mediante gota gruesa, prueba rápida inmunocromatográfica (Bioline™ Malaria Ag P.f/P.v) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las muestras fueron clasificadas tomando como referencia los resultados obtenidos por microscopía, reconocida como método de referencia (Gold estándar) para el diagnóstico de malaria. Se consideraron positivas para *P. falciparum* o *P. vivax* aquellas en las que se observaron formas parasitarias características en la gota gruesa, según los criterios morfológicos descritos en el Manual de Diagnóstico Microscópico del Instituto Nacional de Salud de Colombia (113). Las muestras sin evidencia de parásitos al examen microscópico fueron clasificadas como negativas, independientemente de los resultados obtenidos por prueba rápida o PCR, dado el rol de la microscopía como criterio diagnóstico principal. Adicionalmente, se clasificaron como positivas para infección por dengue aquellas muestras con resultado positivo para el antígeno NS1, detectado mediante la prueba rápida SD BIOLINE Dengue Duo, siguiendo las instrucciones del fabricante. La presencia de anticuerpos IgM se interpretó como indicativa de infección reciente o activa, mientras que la detección aislada de IgG se consideró evidencia de infección pasada o exposición previa.

Categorización final de las muestras

Con base en esta clasificación, las muestras se agruparon en cuatro categorías para análisis posteriores:

- **CNE:** 31 controles negativos endémicos, correspondientes a muestras negativas para malaria y dengue recolectadas en el departamento del Chocó.
- **CNNE:** 10 controles negativos no endémicos, provenientes de individuos del área urbana del Valle de Aburrá sin antecedentes de exposición.
- **Pf:** 4 muestras positivas para *P. falciparum*.
- **Pv:** 3 muestras positivas para *P. vivax*, de acuerdo con el diagnóstico microscópico.

Procedimiento Bio-SELEX

Depleción de Albúmina e IgG en plasma humano

La depleción de albúmina e inmunoglobulina G (IgG) en muestras de plasma humano se realizó utilizando el *Pierce™ Albumin/IgG Removal Kit* (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 89875), el cual emplea columnas de centrifugación empacadas con una matriz de Cibacron Blue y proteína A inmovilizadas. Todos los pasos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (~23 °C), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se dispensó la resina en columnas de centrifugación, sobre las cuales se aplicaron 75 µL de muestra (compuesta por 10 µL de plasma diluidos en 65 µL de buffer de unión/lavado). La mezcla se incubó con agitación constante durante 10 minutos y luego se centrifugó a 10 000 × g durante 1 minutos para recuperar las proteínas no retenidas. Este procedimiento se repitió una vez para maximizar la eficiencia de la depleción, seguido de un lavado adicional con 75 µL de buffer. El eluido de este último paso se recolectó en el mismo tubo para asegurar una mayor recuperación de proteínas libres de albúmina e IgG humanas. Finalmente, para recuperar la albúmina e IgG unidas a la resina, se añadieron 50 µL de buffer de elución (*Laemmli Sample Buffer*, Bio-Rad, Cat. No. 161-0732). La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 10 000 × g durante 1 minuto. El eluido obtenido fue recolectado y almacenado a -20°C, hasta su uso posterior.

Extracción de proteínas totales a partir de sangre total

La extracción de proteínas totales se realizó a partir de 300 µL de sangre total empleando TRI Reagent® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Cat. No. T-9424), siguiendo un protocolo adaptado para esta matriz. La muestra se mezcló con 1000 µL del reactivo, seguida de la adición de 200 µL de cloroformo, agitación por 15 s e incubación a temperatura ambiente durante 2 minutos. La fase se separó por centrifugación a 12 000 × g durante 15 minutos a 4 °C. La fase intermedia se recuperó y trató con 300 µL de etanol absoluto, centrifugándose a 2000 × g durante 5 minutos a 4 °C. Posteriormente, se añadieron 1000 µL de isopropanol, se incubó por 10 minutos y se centrifugó a 12 000 × g por 10 minutos. El pellet proteico se lavó tres veces con clorhidrato de guanidina 0.3 M en etanol al 95 %, y una vez con etanol absoluto, con centrifugaciones a 7500 × g por 5 minutos entre cada paso. Finalmente, las proteínas se secaron al vacío por 10 minutos, se resuspendieron en SDS al 1 % y se centrifugaron a 10 000 × g por 10 minutos. El sobrenadante fue almacenado a -20 °C para su análisis. Posterior a la extracción de proteínas, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12%, con el objetivo de separar las proteínas según su peso molecular. La corrida se efectuó a 80 V durante 2 horas. Finalizada la separación, los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie R-250 (Bio-Rad, Cat. No. 1610436) para la visualización de las bandas proteicas. Después del proceso de extracción, se realizó la cuantificación de proteínas utilizando el kit BCA Protein Assay (ab102536). Para la curva estándar se empleó albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de concentración de 0 a 1000 ng.

Proceso SELEX

Se obtuvo proteínas albúmina e IgG humana de la fracción recuperada en la columna de depleción correspondiente a los *pools* de controles no endémicos. Asimismo, se prepararon extractos proteicos a partir de muestras de controles negativos endémicos, controles negativos no endémicos, pacientes infectados con *P. vivax* y pacientes positivos para *P. falciparum*. Todos estos *pools* fueron utilizados como blancos en el proceso SELEX. Esta técnica se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Wang et al. (2019), con algunas modificaciones.

La biblioteca de oligonucleótidos utilizada constaba de una región central aleatoria de 40 nucleótidos (N_{40}), flanqueada por dos regiones conservadas en los extremos: 5'-GTCTATATGATCTGTAAGTC- N_{40} -CCAGCAGTGAGTCATCAGAT-3'. Estas secuencias conservadas permitieron la amplificación de los oligonucleótidos entre rondas de selección mediante PCR. Para ello, se emplearon un oligonucleótido sentido (5'-GTCTATATGATCTGTAAGTC-3') y un oligonucleótido antisentido (5'-ATCTGATGACTCACTGCTGG-3'), ambos complementarios a las regiones conservadas de los extremos 5' y 3', respectivamente. La amplificación de los oligonucleótidos se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando la mezcla maestra comercial OneTaq® 2X Máster Mix with Standard Buffer (New England Biolabs), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada reacción se preparó en un volumen final de 50 μ L, conteniendo 25 μ L de OneTaq® Máster Mix, 1 μ L (10 pmol) de cada cebador (sentido y antisentido), la plantilla correspondiente y agua grado molecular hasta completar el volumen final. El protocolo de termociclado incluyó una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 55 °C por 30 segundos y extensión a 68 °C por 30 segundos. Finalmente, se realizó una extensión final a 68 °C durante 5 minutos. En total, se realizaron 6 rondas de selección negativa y 9 rondas de selección positiva.

Para las rondas de selección negativa y positiva del proceso SELEX, las proteínas fueron inmovilizadas en placas de poliestireno de 96 pozos utilizando tampón carbonato-bicarbonato (pH 9.6) como solución de recubrimiento. La fijación se llevó a cabo incubando las placas a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, se realizaron tres lavados con 100 μ L de tampón PBS 1X para eliminar el exceso de proteína no adherida. Para iniciar la ronda de selección negativa, se preparó una mezcla que contenía 1000 ng de la biblioteca de oligonucleótidos en buffer SELEX. Esta mezcla fue desnaturalizada mediante calentamiento a 95 °C durante 5 minutos, seguida de enfriamiento en hielo por 2 minutos, antes de ser añadida a los pozos con las proteínas inmovilizadas. Durante las rondas de selección negativa, se utilizaron como blancos proteínas no específicas: fracciones de albúmina e IgG humanas recuperadas de columnas de depleción, albúmina sérica bovina (BSA), extractos proteicos de controles negativos no expuestos (CNNE) y expuestos (CNE). En el caso de la selección contra *P. falciparum*, se incluyeron extractos de *P. vivax* como blancos negativos, y viceversa, con el objetivo de minimizar la reactividad cruzada y de descartar las secuencias que tengan afinidad por blancos no específicos o no deseados.

Para las rondas de selección positiva, se emplearon extractos proteicos totales de muestras positivas para *P. falciparum* o *P. vivax*, según correspondiera al objetivo de cada ciclo. Durante estas rondas, tanto la concentración de proteína inmovilizada como los tiempos de incubación fueron ajustados progresivamente, con el propósito de incrementar la presión selectiva sobre las secuencias más afines y específicas presentes en la biblioteca, tal como se representan en las tabla 2 y 3. Los complejos formados entre las proteínas y los oligonucleótidos de ADNss se eluyeron utilizando 50 μ l de agua a 95 °C, y las secuencias recuperadas fueron amplificadas mediante PCR (9 ciclos), siguiendo el protocolo previamente descrito.

La figura 8 resume esquemáticamente el proceso completo de la metodología Bio-SELEX aplicada en este estudio.

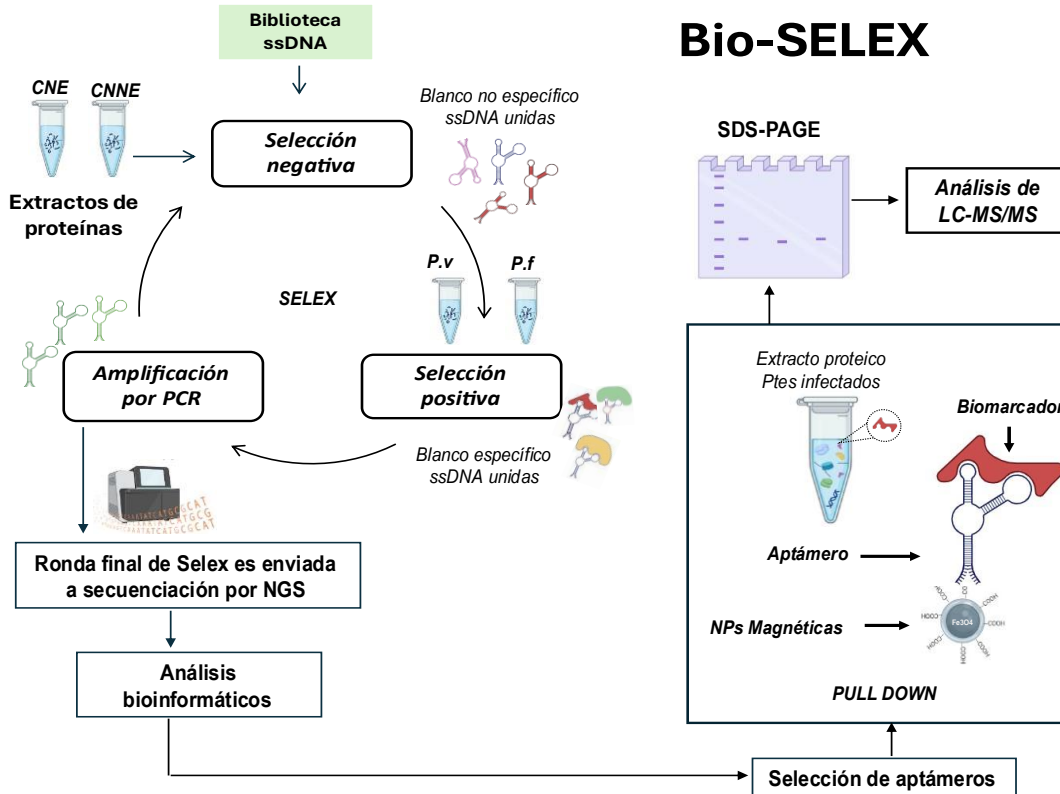


Figura 8. Esquema general de la estrategia Bio-SELEX utilizada para obtener aptámeros que reconocen biomarcadores específicos de *P. falciparum* y *P. vivax*.

Se emplearon extractos de proteínas obtenidos a partir de sangre total. El proceso incluye una fase de selección negativa contra controles negativos endémicos (CNE) y controles negativos no endémicos (CNNE), seguida de una selección positiva frente a proteínas de pacientes infectados (P.f y P.v). Tras cada ciclo de selección, los aptámeros se amplificaron mediante PCR. La ronda final de SELEX fue sometida a secuenciación de nueva generación (NGS) y posterior análisis bioinformático. Los aptámeros seleccionados fueron utilizados en ensayos de Pull-Down con nanopartículas magnéticas, permitiendo la captura de biomarcadores, los cuales fueron identificados mediante SDS-PAGE y análisis por LC-MS/MS. **Abreviaturas:** ssDNA: ADN de cadena sencilla; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; NGS: secuenciación de nueva generación; SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio; LC-MS/MS: espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida; NPs: nanopartículas.

Los detalles de las concentraciones de proteína y tiempos de incubación empleados en cada ronda de selección se presentan en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. Concentraciones y tiempos de incubación empleados para cada una de las rondas de selección de *P. falciparum*.

Bio-SELEX rounds	Muestra	Prot conc. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Tipo de ronda	Temp.	Incubación (min)
1	IgG – Alb CNE	1000	Negativa	23°C	30
2	BSA	1000	Negativa	23° C	30
3	P CNNE	1000	Negativa	23°C	30
4	P CNE	1000	Negativa	23°C	30
5	P Pv	1000	Negativa	23°C	30
6	P Pv	1000	Negativa	23°C	30
7	P Pf	1000	Positiva	23° C	30
8	P Pf	800	Positiva	23° C	30
9	P Pf	600	Positiva	23°C	20
10	P Pf	400	Positiva	23°C	20
11	P Pf	200	Positiva	23°C	15
12	P Pf	100	Positiva	23°C	15
13	P Pf	2000	Positiva	23°C	10
14	P Pf	3000	Positiva	23°C	10

Tabla 3. Concentraciones y tiempos de incubación empleados para cada una de las rondas de selección de *P. vivax*.

Bio-SELEX rounds	Muestra	Prot conc. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Tipo de ronda	Temp.	Incubación (min)
1	IgG – Alb CNE	1000	Negativa	23°C	30
2	BSA	1000	Negativa	23° C	30
3	P CNNE	1000	Negativa	23°C	30
4	P CNE	1000	Negativa	23°C	30
5	P Pf	1000	Negativa	23°C	30
6	P Pf	1000	Negativa	23°C	30
7	P Pv	1000	Positiva	23° C	30
8	P Pv	800	Positiva	23° C	30
9	P Pv	600	Positiva	23°C	20
10	P Pv	400	Positiva	23°C	20
11	P Pv	200	Positiva	23°C	15
12	P Pv	100	Positiva	23°C	15
13	P Pv	2000	Positiva	23°C	10
14	P Pv	3000	Positiva	23°C	10

Cuantificación de ssDNA unidas en cada ronda mediante PCR en tiempo real (qPCR)

Con el propósito de estimar la concentración relativa de aptámeros unidos (MU) tras cada ronda de selección positiva del proceso SELEX, se implementó un protocolo de cuantificación basado en PCR en tiempo real (qPCR), empleando una curva estándar generada a partir del producto de PCR correspondiente a las moléculas unidas de la Ronda 1.

Preparación de la curva estándar

Como molde para la curva estándar se utilizó el ADN amplificado por PCR punto final correspondiente a las moléculas unidas (MU) recuperadas tras la primera ronda de selección positiva. La cuantificación inicial del ADN se realizó mediante espectrofotometría (NanoDrop™), obteniendo una concentración de 495,2 ng/μL. A partir de esta muestra, se prepararon diluciones seriadas 1:10 hasta obtener un rango de seis concentraciones: 20, 2, 0,2, 0,02, 0,002 y 0,0002 ng/μL. Las diluciones fueron analizadas por duplicado, descartando las más bajas por pérdida de linealidad en la curva de amplificación.

Condiciones de la reacción y protocolo de termociclaje

Las reacciones de qPCR se realizaron en un volumen final de 10 μL, utilizando el reactivo PowerUp™ SYBR® Green Máster Mix (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. A25742). La mezcla de reacción estuvo compuesta por 5,0 μL del Máster Mix (2X), 0,5 μL de cebador forward (10 μM), 0,5 μL de cebador reverse (10 μM), 3,0 μL de agua libre de nucleasas y 1,0 μL de ADN (estándar o muestra experimental). Las reacciones se llevaron a cabo en el sistema Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR, siguiendo un programa de amplificación en tres etapas: activación de la ADN polimerasa a 50 °C durante 2 minutos, desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos, seguida de 20 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 segundos, alineamiento a 55 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos. Al finalizar los ciclos de amplificación, se ejecutó una curva de disociación (*Melt curve*) para confirmar la especificidad de los productos amplificados. Esta curva consistió en un aumento progresivo de temperatura desde 60 °C hasta 95 °C, con incrementos de 0,5 °C cada 5 segundos y detección continua de fluorescencia. La presencia de un único pico en la curva confirmó la especificidad de la amplificación.

Cuantificación de moléculas unidas (MU)

Para garantizar que las muestras experimentales se mantuvieran dentro del rango de la curva estándar, cada una de las muestras correspondientes a las moléculas unidas (MU) recuperadas tras cada ronda de selección positiva fue diluida en una proporción 1:10 antes de la cuantificación. Las muestras diluidas fueron analizadas mediante qPCR bajo las condiciones descritas. Los valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos fueron interpolados en la curva estándar para estimar la concentración relativa de aptámeros en ng/μL. Finalmente, estas concentraciones fueron comparadas con los valores obtenidos mediante espectrofotometría (NanoDrop™), lo cual permitió validar la eficiencia del proceso de selección y caracterizar el patrón de enriquecimiento de secuencias específicas a lo largo de las distintas rondas del protocolo SELEX.

4.5 Análisis estadísticos y bioinformáticos

Secuenciación y análisis bioinformático

Tras completar las rondas de selección por SELEX, los productos de PCR correspondientes a la última ronda de los ensayos dirigidos contra *P. falciparum* y *P. vivax* fueron enviados a Admera Health Biopharma Services para su secuenciación de alto rendimiento. Por medio de secuenciación de siguiente generación (NGS) usando el equipo ilumina 2x250.

Los archivos generados en formato .fastq.gz fueron procesados en Python 3.12.6. para identificar las secuencias que contenían adaptadores de Illumina y las regiones conservadas flanqueantes del diseño de la biblioteca SELEX. Se extrajeron aquellas secuencias que incluían la región aleatoria de 40 nucleótidos (N40), correspondiente a los aptámeros candidatos. La calidad de las lecturas fue evaluada mediante *FastQC* (v0.12.1) (114). Las secuencias válidas fueron analizadas con la suite *AptaSUITE* (v0.9.8)(115), con el objetivo de caracterizar la composición del pool enriquecido y obtener una visión general del experimento.

Para el análisis detallado de secuencias, se utilizó *FASTAptameR 2.0* (116), que permitió realizar el conteo de secuencias únicas, el agrupamiento por similitud (clustering) bajo criterios de lectura mínima y divergencia restringida, así como la identificación de motivos conservados mediante la función *Motif Discovery*. Los motivos más representativos fueron alineados utilizando *ClustalW*(117) para detectar patrones estructurales comunes.

A partir de estos motivos conservados se diseñaron aptámeros modulares cortos (≤ 35 nucleótidos), optimizados para presentar accesibilidad estructural en sus regiones funcionales, estabilidad en la estructura secundaria (ΔG negativo) y una longitud compatible con síntesis química eficiente. Las estructuras tridimensionales de ARN se predijeron con *RNAComposer*(118), y posteriormente se convirtieron en modelos 3D de ADN utilizando *Discovery Studio Visualizer* (versión 25.1.0) (119), mediante la sustitución de residuos de uracilo por timina y la modificación del azúcar ribosa por desoxirribosa.

Este procedimiento se adoptó siguiendo el protocolo propuesto por diversos investigadores, ya que las herramientas disponibles no permiten modelar ssDNA de manera automatizada y precisa a partir de secuencias lineales.

Síntesis del aptámero

Las secuencias de aptámeros con mayor representatividad, identificadas tras la estrategia SELEX, la secuenciación y el análisis bioinformático de *P. falciparum* y *P. vivax*, fueron enviadas para su síntesis a la empresa MacroGene. En total, se solicitaron cuatro aptámeros: dos correspondientes a *P. vivax*, incluyendo una variante modular generada posterior a los análisis bioinformáticos, y dos correspondientes a *P. falciparum*, siguiendo la misma estrategia para incluir la variante modular identificada.

Evaluación de la interacción aptámero-proteína

Recolección y uso de muestras clínicas (Fase II)

Durante la Fase II del estudio, se recolectaron 17 muestras clínicas de sangre total provenientes de individuos con diagnóstico confirmado de malaria, atendidos en centros de salud de los municipios de Cértegui, Cantón de San Pablo, Condoto, Río Iró y Las Ánimas (departamento del Chocó, Colombia). y almacenadas en tubos con EDTA hasta su procesamiento.

El diagnóstico clínico se realizó utilizando los mismos métodos empleados en la Fase I, que incluyeron: gota gruesa, prueba rápida de antígeno y PCR de género. No obstante, por dificultades logísticas en el proceso de recolección, la persona encargada no remitió las láminas de gota gruesa necesarias para realizar una doble confirmación microscópica independiente. A pesar de ello, se recibió documentación con el resultado de la especie infectante para cada paciente, elaborada por personal capacitado en lectura de láminas. Esta información, si bien incompleta en cuanto a recuento parasitario o morfología, fue considerada confiable, ya que no se observaron discrepancias entre los métodos diagnósticos aplicados.

Con base en la especie identificada, las muestras fueron agrupadas en dos pools independientes: uno para *P. falciparum* y otro para *P. vivax*. Estos pools fueron utilizados exclusivamente en el ensayo EMSA, como parte del proceso de validación funcional preliminar de los aptámeros seleccionados, con el objetivo de evaluar su capacidad de interacción en un contexto clínico real.

Ensayo de retardamiento de movilidad electroforética (EMSA)

Con el propósito de evaluar la interacción entre los aptámeros diseñados y proteínas provenientes de *P. falciparum* y *P. vivax*, se implementó un ensayo de electroforesis de movilidad en gel (EMSA, por sus siglas en inglés), utilizando geles de agarosa al 2,5 % preparados en tampón TB 0,5x.

Para la preparación del gel de agarosa al 2,5 %, se mezcló 1,25 g de agarosa con 45 mL del tampón TB 0,5x. La mezcla se calentó en horno microondas durante 1 minuto y 30 segundos, con agitación cada 10 segundos para evitar sobre ebullición. Posteriormente, la solución se vertió en una bandeja de gel, obteniendo un espesor aproximado de 7 mm, y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

Los aptámeros utilizados (Pf, Pf_Mut, Pv y Pv_Mut) se reconstituyeron a una concentración de 100 pM. Para cada reacción, se tomaron 0,33 µL del stock del aptámero correspondiente y se diluyeron con buffer SELEX hasta alcanzar un volumen de 20 µL. Esta solución fue sometida a 95 °C durante 10 minutos para desnaturalizar posibles estructuras secundarias preformadas, seguida de un enfriamiento inmediato en hielo durante 2 minutos para favorecer el plegamiento estructural hacia su conformación funcional. A cada tubo que contenía el aptámero plegado se adicionaron 20 µL del respectivo pool de proteínas: Pf_Selex (3490 µg/µL), Pf_Nuevo (846 ng/µL), Pv_Selex (1890 ng/µL), Pv_Nuevo (558 ng/µL) o sangre total de pacientes positivos. El volumen final por reacción fue de 40 µL. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente (≈ 23 °C) con agitación a 60 RPM, permitiendo la interacción específica entre los aptámeros y sus posibles dianas proteicas. Posterior a la incubación, se cargaron 20 µL de cada mezcla sobre el gel de agarosa al 2,5 %, y se realizó la electroforesis bajo una diferencia de potencial de 100 V durante 30 minutos. Se utilizó como control negativo el aptámero incubado en ausencia de proteína. Para referencia de movilidad se incluyó un marcador de peso molecular de 50 a 3000 pb.

La interacción aptámero-proteína se determinó por la presencia de bandas de migración retardada, correspondientes a los complejos formados, en comparación con la banda del aptámero libre. Este patrón permitió inferir la formación de interacciones específicas entre los aptámeros y las proteínas presentes en los distintos pools evaluados.

Pull-Down

Con el objetivo de evaluar la capacidad de unión entre los aptámeros diseñados (Pf y Pv) y sus variantes modulares (Pf_Mut y Pv_Mut) frente a extractos de proteínas totales de pacientes con malaria por *P. falciparum* y *P. vivax*, se realizó un ensayo tipo Pull-down utilizando nanopartículas magnéticas funcionalizadas con grupos carboxilo (MNPs-COOH). Este enfoque permitió inmovilizar los aptámeros y evaluar su capacidad para identificar proteínas específicas presentes en los extractos biológicos.

Inicialmente, se añadieron 100 µL de MNPs-COOH (10 mg/mL) a cada tubo de reacción. Los tubos fueron colocados sobre una gradilla magnética durante un minuto para separar las nanopartículas, y se descartó el buffer ácido en el que estaban suspendidas. Posteriormente, las MNPs fueron lavadas tres veces con buffer MES (10 mM MES, 75 mM NaCl y 25 mM CaCl₂ anhidro).

Los aptámeros fueron diluidos en buffer SELEX hasta alcanzar una concentración final de 20 ng en 100 μ L. Para inducir su plegamiento estructural, cada solución fue calentada a 95 °C durante 10 minutos y enfriada en hielo durante 2 minutos. A continuación, se añadieron 100 μ L de aptámero a las MNPs previamente lavadas, e incubaron durante 15 minutos en hielo para permitir su acoplamiento a la superficie funcionalizada. Finalizada la incubación, las nanopartículas fueron separadas con ayuda de la gradilla magnética y se retiró el sobrenadante no unido. Posteriormente, se añadieron 20 μ L de extracto de proteínas totales, previamente diluidos en 80 μ L de buffer SELEX, a cada una de las reacciones correspondientes. Los extractos utilizados provenían de pools de *P. falciparum* (3490 ng/ μ L; 69,8 μ g por muestra) y *P. vivax* (1890 ng/ μ L; 37,8 μ g por muestra), utilizados también en las rondas previas de selección. Las muestras fueron incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente, con agitación constante a 60 RPM para favorecer la formación de complejos aptámero–proteína. Finalizada la incubación, las MNPs fueron separadas mediante magnetismo y se realizaron tres lavados consecutivos con PBS 1X. Entre cada lavado se aplicó una agitación leve para eliminar proteínas no específicamente unidas.

Como control negativo del ensayo, se incluyó una condición en la que las MNPs-COOH fueron incubadas únicamente con los extractos proteicos, sin adición de aptámeros. Esta condición permitió identificar posibles uniones inespecíficas de proteínas a la superficie de las nanopartículas.

Luego, se añadieron 20 μ L de buffer Laemmli 2 \times a cada tubo y se sometieron a calentamiento a 90 °C durante 10 minutos, con el fin de desnaturalizar las proteínas retenidas y permitir su posterior análisis. Las muestras resultantes fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 8 % bajo condiciones desnaturalizantes. Se utilizó un marcador de peso molecular como referencia, y las proteínas fueron reveladas mediante tinción con azul de Coomassie.

Filtrado bioinformático por peso molecular

Con el propósito de identificar proteínas candidatas con relevancia diagnóstica, vacunal o terapéutica en *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, se implementó un enfoque bioinformático de doble filtrado: inicialmente por peso molecular teórico y, posteriormente, por evidencia científica de interés biomédico.

En primera instancia, se descargaron los proteomas completos de ambas especies desde la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>), versión 2024. El proteoma de *P. falciparum* correspondió al identificador UP000001450, con un total de 5.361 proteínas, mientras que el de *P. vivax* fue UP000008333, compuesto por 5.438 proteínas. Ambos archivos, en formato FASTA, fueron procesados para estimar el peso molecular teórico de cada proteína con base en su secuencia primaria. Para ello, se desarrolló una herramienta personalizada en Python que calcula el peso molecular teórico mediante la suma de los pesos promedio de los residuos aminoacídicos individuales, descontando 18.015 Da por cada enlace peptídico, correspondiente a la pérdida de agua que ocurre durante la formación de dichos enlaces en la biosíntesis natural de proteínas. Este cálculo permitió obtener una estimación precisa del peso molecular de cada proteína en kiloDaltons (kDa).

Posteriormente, se aplicó un filtrado por peso molecular con base en la observación de las bandas retenidas en el gel SDS-PAGE tras el ensayo Pull-Down, cuyos patrones de migración indicaban la presencia predominante de proteínas entre 50 y 95 kDa. Para compensar posibles desviaciones causadas por modificaciones postraduccionales, formación de complejos o errores de estimación, se amplió el rango ± 5 kDa. En consecuencia, se establecieron los siguientes intervalos de selección: para *P. falciparum*, 50–65 kDa, 70–85 kDa y 90–104 kDa; y para *P. vivax*, 50–65 kDa y 70–85 kDa. Las proteínas que cumplían con estos criterios

fueron extraídas, organizadas por subgrupo y depuradas de metadatos taxonómicos redundantes, tal como se detalla en el Anexo 10.

Una vez obtenido este subconjunto reducido, se procedió con un segundo filtrado orientado a identificar proteínas con evidencia previa de haber sido empleadas en investigaciones relacionadas con diagnóstico, desarrollo de vacunas o evaluación como blancos terapéuticos. Para ello, se extrajeron los nombres funcionales y los identificadores UniProt de todas las proteínas filtradas y se realizaron búsquedas automatizadas y curación manual en diversas bases de datos, incluyendo UniProtKB, PubMed, PlasmoDB, IEDB (Immune Epitope Database) y el Protein Data Bank (PDB). Se priorizaron aquellas proteínas cuya denominación coincidía con términos frecuentemente reportados en la literatura, tales como AMA-1 (*Apical Membrane Antigen 1*), MSP-1 (*Merozoite Surface Protein 1*), CSP (*Circumsporozoite Protein*), CyRPA (*Cysteine-Rich Protective Antigen*), Plasmepsin V, E140 y PfMDR1 (*Multidrug Resistance Protein 1*), entre otros. Estas proteínas fueron seleccionadas no solo por su recurrencia en estudios experimentales, sino también por su papel en etapas clave del ciclo biológico del parásito, como la invasión eritrocitaria, la evasión inmune o la resistencia a fármacos antipalúdicos.

5. RESULTADOS

OBJETIVO 1: Describir los patrones sociodemográficos y epidemiológicos de la población participante del estudio de los municipios de Chocó.

Se recolectó información sociodemográfica y clínica de un total de 48 individuos, mediante la aplicación de un cuestionario estructurado. A continuación, se describen las principales características de la población incluida en el estudio.

Patrones sociodemográficos

Se reclutaron 48 individuos provenientes de una región endémica para malaria. La edad media fue 38,7 años (IC 95 %: 33,4 – 44,0). Se observó un leve predominio de hombres (54,2 %, n = 26) sobre mujeres (45,8 %, n = 22). En cuanto al origen geográfico, los participantes procedían principalmente de Las Ánimas (25,0 %) y Cantón de San Pablo (25,0 %), seguidos de Condoto (10,4 %), Río Iró (10,4 %) y Cértegui (8,3 %). Analizando el tipo de residencia, la mayoría vivía en zonas urbanas (76,3 %), mientras que el 23,7 % restante residía en áreas rurales Figura 9.

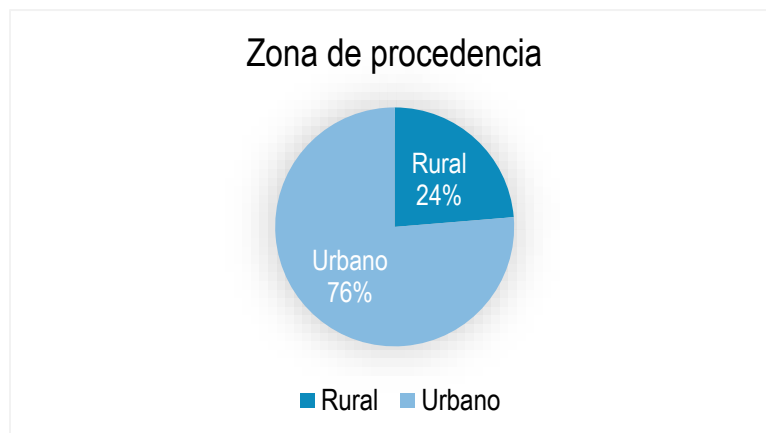


Figura 9. Zona de procedencia de los pacientes incluidos en la primera fase del estudio (n = 48).

Signos y síntomas clínicos

Entre los signos y síntomas más frecuentemente reportados se encontraron fiebre (64,6%), cefalea (60,4%), escalofríos (43,8%) y cansancio (41,7%). También se reportaron inapetencia, mialgia, dolor abdominal, artralgias, prurito, adenopatías y dolor retroocular en menor proporción, ver figura 10.

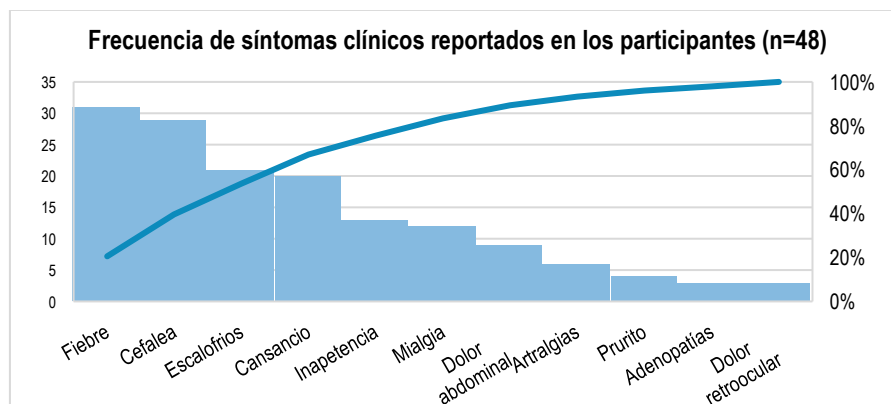


Figura 10. Frecuencia de síntomas clínicos reportados por los participantes del estudio (n = 48). Gráfico de Pareto que muestra la frecuencia absoluta de los síntomas clínicos más comunes reportados por los participantes. Esta caracterización clínica apoya la validez de las muestras recolectadas y sugiere compatibilidad con cuadros típicos de malaria.

Identificación de aptámeros y Biomarcadores

OBJETIVO 2 : Identificar aptámeros y biomarcadores específicos para las especies *P. vivax* y *P. falciparum*

Clasificación de las muestras

Se analizó un total de 48 muestras mediante RDT, PCR y gota gruesa. La microscopía identificó 7 muestras positivas, la PCR 4, todas concordantes con la microscopía, y la RDT 6 con escasa coincidencia con las anteriores. Los resultados obtenidos mediante las distintas técnicas diagnósticas (RDT, PCR y gota gruesa) se ilustran en los Anexos 5 y 6, los cuales incluyen registros fotográficos representativos de los dispositivos inmunocromatográficos utilizados, los gels de electroforesis con productos del gen 18S.

El índice Kappa de Fleiss fue 0.578 (acuerdo moderado). Los índices Kappa de Cohen por pares fueron: RDT vs PCR = 0.388 (acuerdo débil), RDT vs GG = 0.621 (acuerdo sustancial), PCR vs GG = 0.695 (acuerdo sustancial). La sensibilidad de RDT y PCR fue de 57.1%, mientras que la especificidad fue de 97.6% para RDT y de 100% para PCR.

Tabla 4. Resultados individuales de las muestras positivas para malaria según al menos una de las pruebas diagnósticas aplicadas

ID	MICROSCOPIA	ESPECIE	FORMA PARASITARIA	PRUEBA RÁPIDA	ANTIGENO DETECTADO	PCR GÉNERO
32	Negativa	N/A	N/A	Positivo <i>P.f</i>	HRP2	Negativo
35	Positiva	<i>P. falciparum</i>	Trofozoítos	Positivo <i>P.f</i>	HRP2	Positivo
37	Positiva	<i>P. falciparum</i>	Gametocitos	Negativo	N/A	Negativo
38	Positiva	<i>P. vivax</i>	Trofozoítos	Positivo <i>P.v</i>	LDH	Positivo
40	Positiva	<i>P. falciparum</i>	Gametocitos	Negativo	N/A	Negativo
44	Positiva	<i>P. vivax</i>	Trofozoítos	Positivo <i>P.v</i>	LDH	Negativo
45	Positiva	<i>P. falciparum</i>	Trofozoítos	Positivo <i>P.f</i>	LDH/HRP2	Positivo
46	Positiva	<i>P.vivax</i>	Trofozoítos	Positivo <i>P.v</i>	LDH	Positivo

Tabla 5. Número total de muestras positivas y negativas por método diagnóstico (N = 48).

Prueba diagnóstica	Positivas	Negativas	Total
Microscopía	7	41	48
Prueba rápida (RDT)	6	42	48
PCR	4	44	48

Con base en los resultados obtenidos a partir de las tres pruebas diagnósticas (microscopía, RDT y PCR), las 48 muestras analizadas se clasificaron en cuatro categorías diagnósticas:

- **CNE (Controles Negativos Endémicos):** 10 muestras provenientes de individuos residentes en zonas endémicas para malaria, sin infección detectable por ninguno de los métodos aplicados.
- **CNNE (Controles Negativos No Endémicos):** 31 muestras obtenidas de individuos sin antecedentes de exposición en zonas endémicas, y que resultaron negativas en todas las pruebas.
- **(Positivas para *P. falciparum*):** 4 muestras que dieron positivo para *P. falciparum* en al menos una de las pruebas.
- **Pv (Positivas para *P. vivax*):** 3 muestras identificadas como positivas para *P. vivax*.

Cuantificación de las proteínas extraídas

Las concentraciones se determinaron por ensayo BCA (Pierce™ BCA Protein Assay, Thermo Fisher). Estos valores se emplearon para la realización de los ciclos de selección Bio-SELEX.

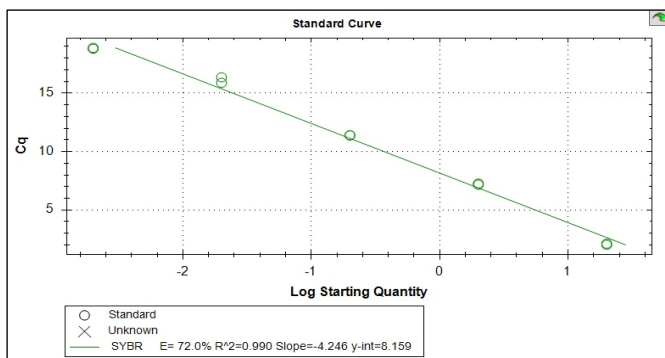
ID	Concentración inicial
Pools <i>P. falciparum</i>	3.490 ng/μL
Pools <i>P. vivax</i>	1.890 ng/μL
Pools CNE	4.190 ng/μL
Pools CNNE	1.690 ng/μL
Alb-IgG CNNE	507 ng/μL
Alb-IgG CNE	478 ng/μL

CNE: Control Negativo de zona endémica, **CNNE:** Control Negativo de zona No endémica, **Pools *P. falciparum*/*P. vivax*:** Pacientes infectados con el parásito, **Alb-IgG CNNE:** Fracción recuperada tras depleción de albúmina de pacientes negativos de zona no endémica, **Alb-IgG CNE:** Fracción recuperada tras depleción de albúmina de pacientes negativos de endémica.

Los perfiles proteicos correspondientes a estos extractos, así como las fracciones resultantes del proceso de depleción de albúmina, se presentan en los Anexos 7 y 8.

Cuantificación de ssDNA unidas en cada ronda mediante PCR en tiempo real (qPCR)

La curva estándar mostró una alta linealidad ($R^2 = 0.990$), con un valor de pendiente de -4.246 , lo cual corresponde a una eficiencia de amplificación del 72.0 %. Los valores obtenidos en cada una de las rondas se detallan en la figura. 11.

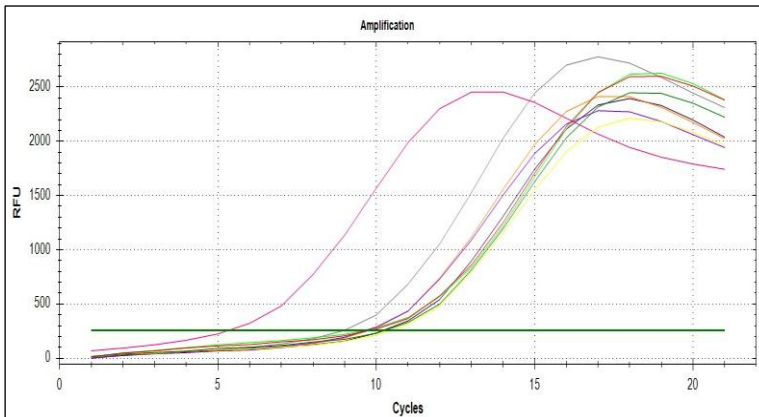


Diluciones	Ct
20 ng	2.02
20 ng	2.12
2.0 ng	7.27
2.0 ng	7.16
0.2 ng	11.40
0.2 ng	11.38
0.02 ng	18.88
0.02 ng	18.80
0.002 ng	16.35
0.002 ng	15.8

Figura 11. Curva estándar obtenida mediante qPCR con diluciones seriadas del producto de PCR correspondiente a las moléculas unidas (MU) de la Ronda 1.

Los valores de Ct fueron graficados frente al logaritmo de la concentración, obteniéndose una regresión lineal con coeficiente de correlación $R^2 \geq 0.99$, lo cual valida la eficiencia del ensayo para cuantificación relativa.

Curva de amplificación de las moléculas unidas tras rondas de selección positiva contra *P. falciparum*.

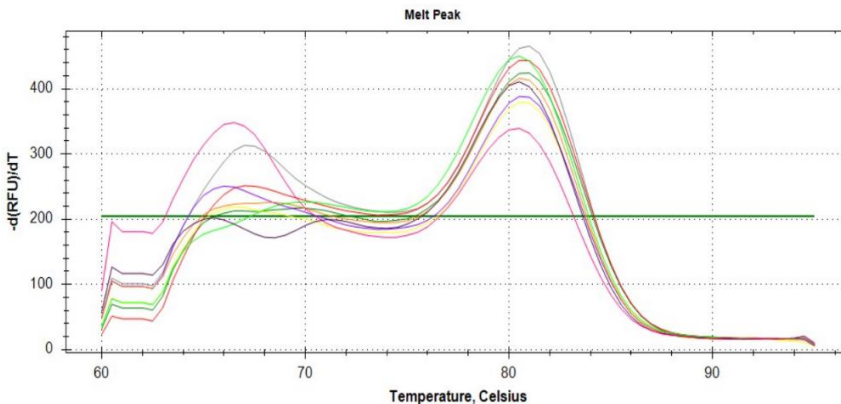


	ID	Ct	Concentración Diluida	Conc final	Conc NanoDrop
R1	falciparum				
R2	Ronda 1 MU	5.28	4,29	42,88	5,3
R3	Ronda 2 MU	9.54	0,48	4,75	3,8
R4	Ronda 3 MU	9.70	0,44	4,38	8,6
R5	Ronda 4 MU	9.62	0,46	4,56	3,9
R6	Ronda 5 MU	10.39	0,31	3,07	4,2
R7	Ronda 6 MU	9.72	0,43	4,33	9,3
R8	Ronda 7 MU	10.22	0,33	3,36	11,7
R8	Ronda 8 MU	8.92	0,65	6,55	7,3
R9	Ronda 9 MU	10.17	0,34	3,43	8,3

Figura 12. Curvas de amplificación por qPCR de las moléculas unidas (MU) tras cada ronda de selección positiva contra *P. falciparum*.

El gráfico evidenció la fluorescencia acumulada (RFU) en función del número de ciclos, correspondiente a cada una de las 9 rondas de selección positiva. Se observó diferencias en los valores de Ct entre las distintas curvas, siendo las más tempranas indicativas de una mayor concentración relativa de moléculas unidas. Las curvas correspondientes a las rondas 1 y 8 mostraron un inicio más temprano de amplificación, lo que sugiere un mayor grado de afinidad o abundancia de secuencias seleccionadas en esas etapas. La línea horizontal verde indica el umbral automático de detección establecido por el software del sistema Bio-Rad CFX96™.

Curvas de disociación *Melt curve* de las moléculas unidas (MU) a *P. falciparum* de cada ronda de selección positiva



	ID falciparum	Peak 1	Peak 2
R2	Ronda 1 MU	60,50	80,50
R3	Ronda 2 MU	N/A	80,50
R4	Ronda 3 MU	N/A	80,50
R5	Ronda 4 MU	66,00	80,50
R6	Ronda 5 MU	N/A	80,50
R7	Ronda 6 MU	67,00	80,50
R8	Ronda 7 MU	N/A	81,00
R8	Ronda 8 MU	67,0	81,00
R9	Ronda 9 MU	N/A	80,50

Figura 13. Curvas de disociación *Melt curve* de las moléculas unidas (MU) a *P. falciparum* de cada ronda de selección positiva.

Se observó un pico dominante y reproducible alrededor de los 80,5 °C, indicativo de una amplificación específica y consistente. En la Ronda 1 se identificó además un segundo pico cercano a los 60,5 °C, posiblemente relacionado con productos secundarios o estructuras parcialmente hibridadas. La ausencia de picos múltiples en las rondas avanzadas sugiere una mayor homogeneidad y especificidad en las secuencias seleccionadas tras la presión selectiva del SELEX.

Curva de amplificación de las moléculas unidas tras rondas de selección positiva contra *P. vivax*

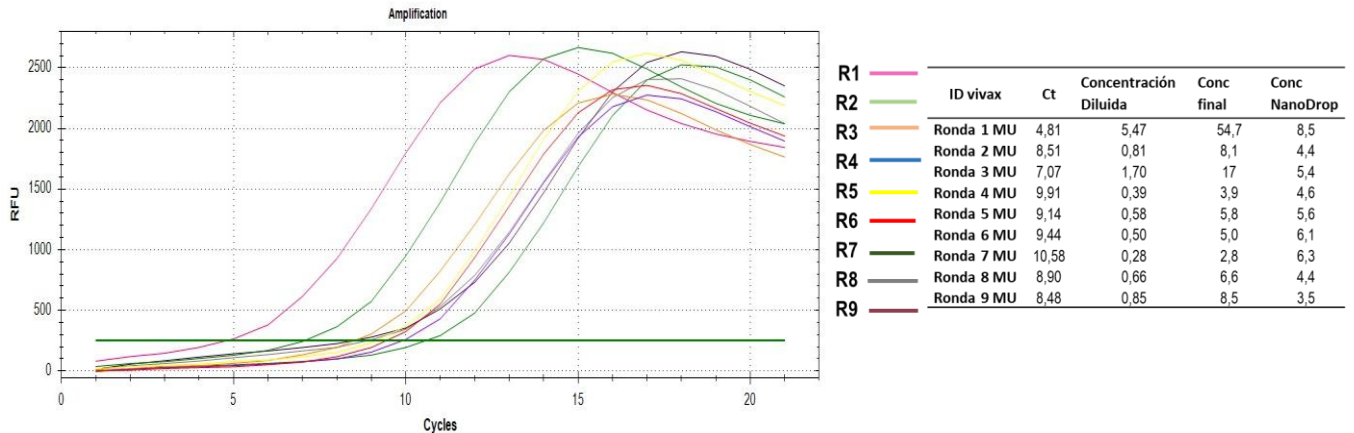


Figura 14. Curvas de amplificación por qPCR de las moléculas unidas (MU) tras cada ronda de selección positiva contra *P. vivax*.

Gráfico obtenido mediante qPCR, muestra la amplificación de moléculas unidas recuperadas tras las rondas de selección positiva 1 a 9. Las muestras fueron previamente diluidas 1:100 para mantener los valores de Ct dentro del rango de la curva estándar. Se observó un incremento progresivo de la fluorescencia relativa (RFU) a lo largo de los ciclos de amplificación. Las curvas correspondientes a las rondas 1, 3 y 9 presentan los Ct más bajos, lo que sugiere una mayor concentración relativa de moléculas unidas en estas etapas y un posible enriquecimiento de secuencias de alta afinidad. La línea horizontal verde indica el umbral automático de detección establecido por el software del sistema Bio-Rad CFX96™.

Curvas de disociación *Melt curve* de las moléculas unidas (MU) a *P. vivax* de cada ronda de selección positiva

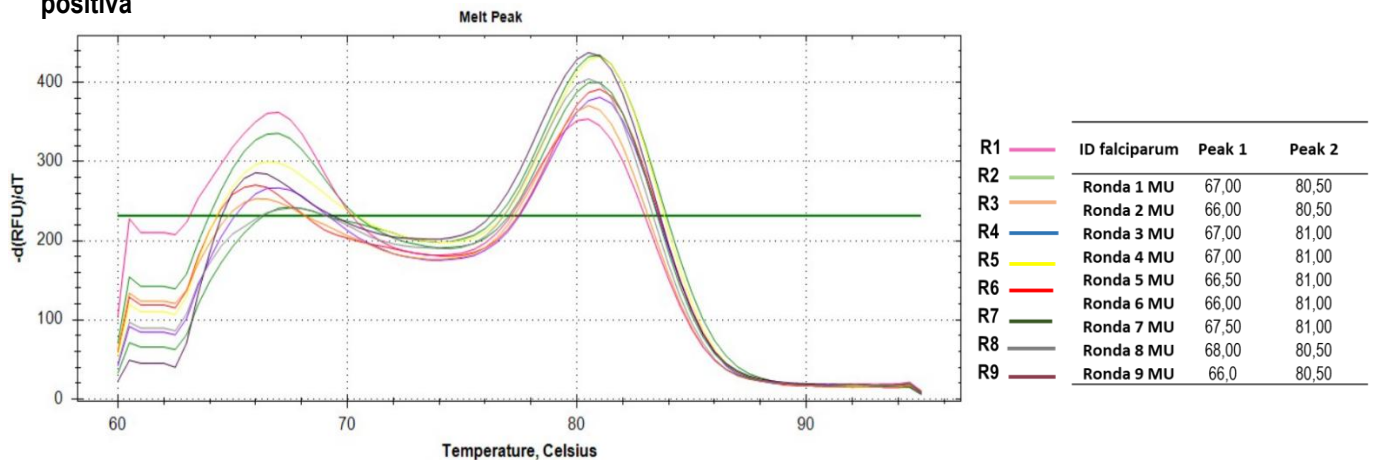


Figura 15. Curvas de disociación (*Melting curve*) de las moléculas unidas (MU) a *P. vivax* tras cada ronda de selección positiva del proceso SELEX.

Gráfico generado a partir de ensayos de qPCR. Se muestran las curvas de disociación correspondientes a las rondas 1 a 9. La mayoría de las rondas presentan un pico dominante de T_m entre 80,0 °C y 80,5 °C, consistente con una amplificación específica de un único producto. No obstante, en todas las rondas se observa también un pico adicional entre 66,0 °C y 68,0 °C, posiblemente atribuible a la presencia de productos secundarios, como dímeros de cebadores o estructuras parcialmente hibridadas. La persistencia de este segundo pico sugiere que, si bien hubo un enriquecimiento progresivo, aún existe heterogeneidad estructural en el pool de aptámeros seleccionados contra *P. vivax*.

ANÁLISIS DE DATOS NGS

Análisis de secuenciación NGS – *P. falciparum*

La secuenciación de la última ronda positiva del proceso Bio-SELEX contra proteínas de *Plasmodium falciparum* generó un total de 401.473 secuencias. De estas, 372.459 contenían adaptadores Illumina, y 141.593 secuencias (35,3 %) presentaban correctamente la región aleatoria de 40 nucleótidos (N_{40}) flanqueada por las secuencias conservadas necesarias para el análisis posterior. Estas secuencias fueron consideradas válidas para el análisis de frecuencia, predicción estructural y descubrimiento de motivos.

El análisis de la distribución de nucleótidos en las lecturas forward reveló un patrón relativamente equilibrado. La base guanina (G) presentó las frecuencias más elevadas, alcanzando picos cercanos a 65.000 lecturas en las primeras posiciones (notablemente en la posición 2) y estabilizándose entre 35.000 y 45.000 lecturas en el resto de la secuencia. Timina (T) mostró un comportamiento similar, con picos superiores a 50.000 lecturas, especialmente entre las posiciones 20 y 35. En contraste, adenina (A) y citosina (C) presentaron frecuencias más bajas y estables, con un promedio de entre 25.000 y 35.000 lecturas por posición.

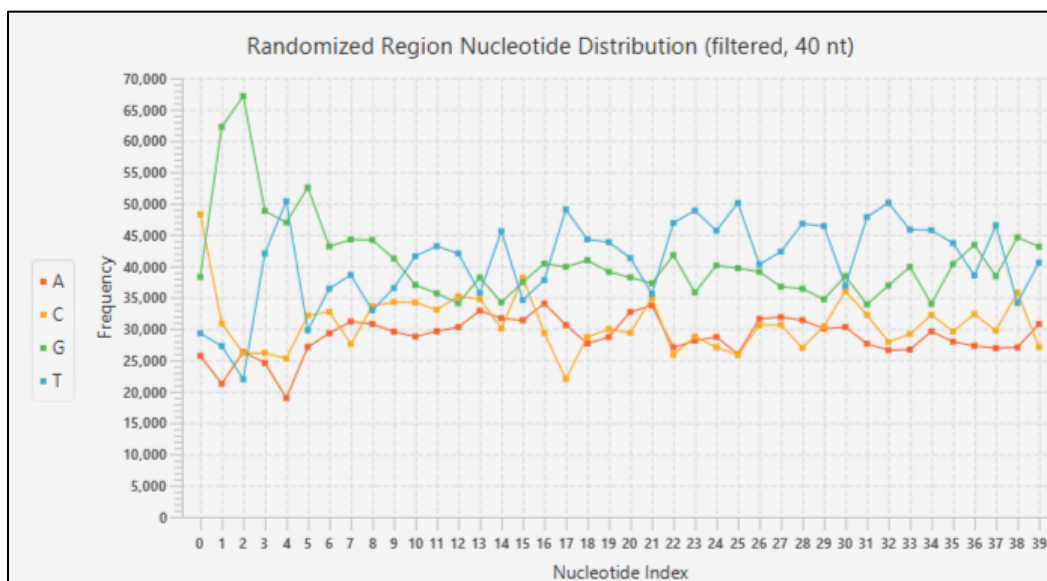


Figura 16. Distribución de nucleótidos en lecturas forward – *P. falciparum*. El análisis de la región aleatoria de 40 nucleótidos, tras el filtrado de calidad y eliminación de adaptadores, mostró una distribución nucleotídica relativamente equilibrada en las secuencias correspondientes a *P. falciparum*.

Análisis de secuenciación NGS – *P. vivax*

En el caso de *P. vivax*, se obtuvo un total de 421.104 secuencias, de las cuales 384.053 contenían adaptadores Illumina. Tras el proceso de filtrado, 152.808 secuencias (36,2 %) fueron clasificadas como válidas, ya que contenían la región N₄₀ completa y correctamente flanqueada, aptas para análisis de frecuencia y predicción estructural.

La distribución de bases nitrogenadas fue en general balanceada, con algunas fluctuaciones en los primeros nucleótidos. Guanina (G) mostró picos de frecuencia más altos en la posición 2, con más de 70.000 ocurrencias, seguido de un descenso progresivo hacia una meseta estable. Timina (T) exhibió una frecuencia sostenida entre las posiciones 8 y 38, con valores entre 45.000 y 60.000 lecturas. Por su parte, adenina (A) y citosina (C) se mantuvieron entre 30.000 y 40.000 lecturas por posición, en proporciones más homogéneas.

Distribución de nucleótidos en lecturas forward – *P. vivax*

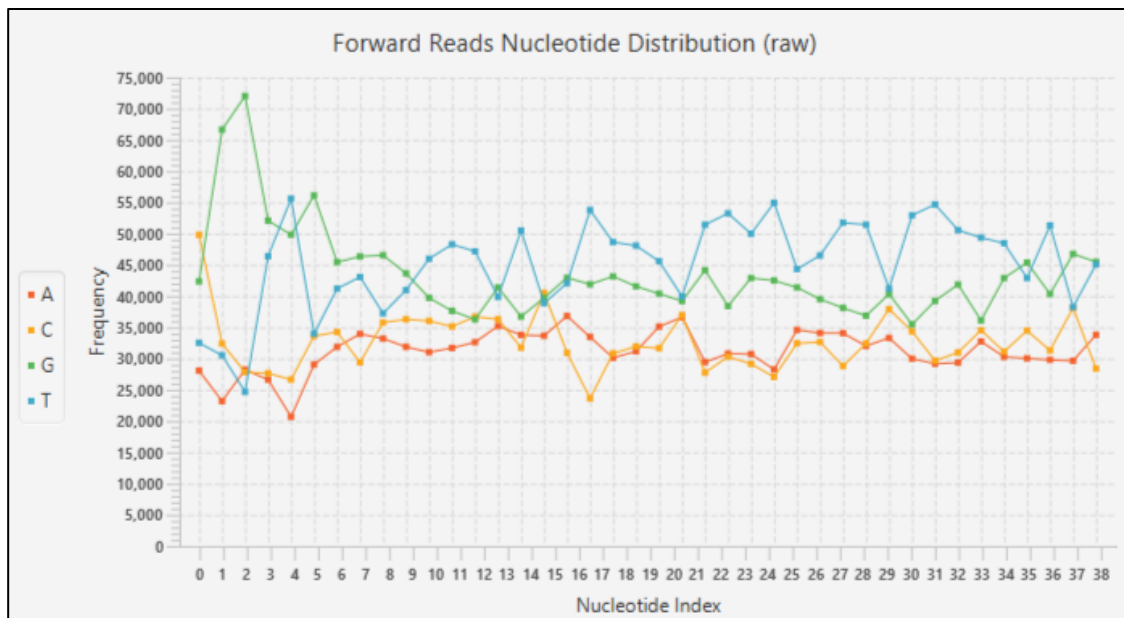


Figura 17. Distribución de nucleótidos en lecturas forward – *P. vivax*

Distribución de frecuencia de las bases nitrogenadas adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T) a lo largo de los 40 nucleótidos de la región aleatoria (N₄₀) en las lecturas forward obtenidas durante la secuenciación de la última ronda positiva del proceso Bio-SELEX contra *P. vivax*.

Selección y síntesis de aptámeros

Con base en el análisis de abundancia relativa y estabilidad estructural secundaria, se seleccionaron cinco aptámeros candidatos para cada especie. En el caso de *P. falciparum*, el aptámero más representado (Top 1) alcanzó 42.392 lecturas, con una energía libre de plegamiento (ΔG) de $-2,4$ kcal/mol. Los otros cuatro aptámeros del Top 5 mostraron 35.325 lecturas cada uno, con valores de ΔG entre $-7,8$ y $-2,0$ kcal/mol.

Para *P. vivax*, tres de los aptámeros más abundantes compartieron 39.283 lecturas y valores de ΔG entre $-8,3$ y $-1,5$ kcal/mol, mientras que los otros dos presentaron 32.736 lecturas, ambos con ΔG de $-8,3$ kcal/mol. La predicción de las estructuras secundarias reveló la presencia de bucles, tallos y horquillas características de estabilidad conformacional, lo cual fue confirmado por las visualizaciones tridimensionales generadas a partir de modelado molecular.

Finalmente, se seleccionaron dos secuencias por especie para síntesis química. Para *P. falciparum*, se sintetizaron el aptámero Top 1 por su alta frecuencia, y un diseño modular optimizado (Pf_Mut) con ΔG de $-8,1$ kcal/mol. Para *P. vivax*, se seleccionaron el Top 1 y un diseño modular modificado (Pv_Mut), con ΔG de $-2,11$ kcal/mol. Estas secuencias fueron posteriormente utilizadas en ensayos EMSA, PullDown como parte del proceso de validación funcional preliminar.

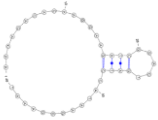
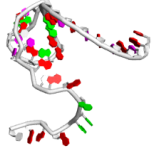
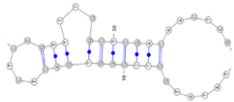

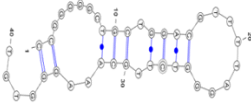
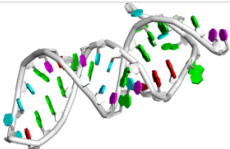
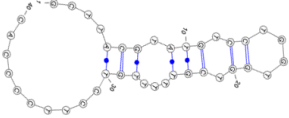
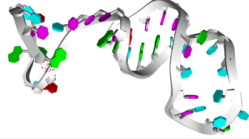
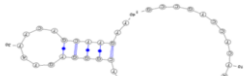
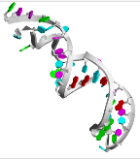


TOP 5	ΔG	READS	ESTRUCTURA 2D	ESTRUCTURA 3D
1	-2,4	42.392		
2	-7,8	35.325		
3	-7,8	35.325		
4	-3,9	35.325		
5	-2	35.325		
Pf_Mut	-8,1			

Figura 18. Aptámeros seleccionados para *P. falciparum*.

Estructuras secundarias (2D) y terciarias (3D) de los cinco aptámeros con mayor abundancia obtenidos en la ronda final de selección positiva contra *P. falciparum*. Se incluyen las predicciones de plegamiento con valores de energía libre (ΔG) indicados para cada uno, así como el diseño modular optimizado Pf_Mut, derivado de los

motivos estructurales predominantes en la biblioteca. Las estructuras 2D fueron generadas mediante RNAfold y las estructuras 3D mediante simulación en RNAComposer y visualización en PyMOL. Estas predicciones orientaron la selección de secuencias para síntesis química y ensayos funcionales.

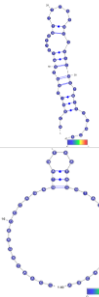
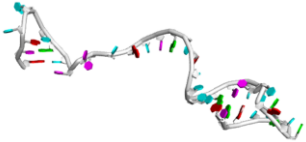
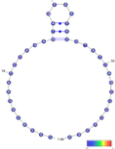
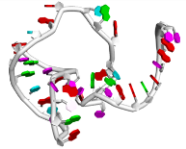
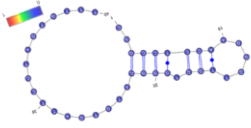
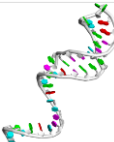
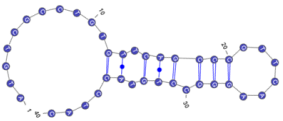

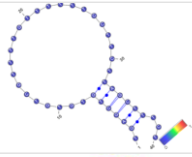
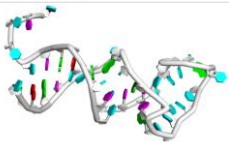

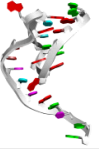
TOP 5	ΔG	READS	ESTRUCTURA 2D	ESTRUCTURA 3D
1	-1,5	39.283		
2	-2,4	39.283		
3	-8,3	39.283		
4	-8,3	32.736		
5	-8,3	32.736		
Pv_Mut	-2,11			

Figura 19. Aptámeros seleccionados para *P. vivax*

Estructuras secundarias (2D) y terciarias (3D) de los cinco aptámeros más abundantes de la ronda final positiva contra *P. vivax*. Se muestran también las predicciones para Pv_Mut, un aptámero modular diseñado con base en la conservación de motivos estructurales. Las estructuras 2D revelan bucles y tallos característicos, mientras que las estructuras 3D confirman plegamientos compactos compatibles con potencial de interacción molecular. Todas las secuencias fueron evaluadas por energía libre de plegamiento y frecuencia relativa antes de su selección para síntesis.

Validaciones funcionales

OBJETIVO 3: Verificar la presencia del biomarcador identificado en muestras sanguíneas de pacientes infectados por *P. vivax* y *P. falciparum*.

Clasificación de las muestras Fase II

Durante la Fase II del estudio se recolectaron un total de 17 muestras de sangre total con diagnóstico confirmado de malaria, provenientes de pacientes atendidos en centros de salud ubicados en cinco municipios del departamento del Chocó: Cértegui, Cantón de San Pablo, Condoto, Río Iró y Las Ánimas. Las muestras fueron recolectadas en tubos con EDTA y conservadas hasta su procesamiento en el laboratorio.

El diagnóstico clínico se realizó empleando la misma triada diagnóstica aplicada en la Fase I: microscopía de gota gruesa, prueba rápida de antígeno HRP2/LDH y PCR anidada dirigida al género *Plasmodium*. No obstante, debido a dificultades logísticas durante la recolección, no se logró la remisión de las láminas de gota gruesa necesarias para efectuar una doble confirmación microscópica independiente. Sin embargo, cada muestra fue acompañada por documentación diagnóstica elaborada por personal capacitado en microscopía, que incluía la especie infectante determinada en campo. A pesar de no contar con información completa sobre recuento parasitario o morfología, no se presentaron discrepancias entre los métodos diagnósticos aplicados, por lo cual los registros fueron considerados confiables para fines clasificatorios.

Con base en esta información, las 17 muestras fueron agrupadas en dos pools según la especie identificada: *Plasmodium falciparum* (n = 10) y *P. vivax* (n = 7). Estos pools fueron empleados exclusivamente en los ensayos EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), como parte de la validación funcional preliminar de los aptámeros seleccionados, con el objetivo de evaluar su capacidad de interacción con proteínas presentes en muestras clínicas reales.

Con el fin de evaluar la capacidad de unión de los aptámeros diseñados frente a proteínas de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, se realizaron ensayos EMSA en gel de agarosa al 2,5 %. En todos los casos se observó un patrón de migración característico, evidenciando la formación de complejos aptámero-proteína.

Interacción de los aptámeros Pf y Pf_Mut con pools de *P. falciparum*

Al incubar el aptámero Pf (20 ng totales) con diferentes extractos proteicos, incluyendo el pool utilizado durante el proceso de selección (Pf_SELEX, 3490 µg/µL), extractos de pacientes positivos para *P. falciparum* obtenidos en la segunda fase del estudio (Pf_Nuevo, 846 ng/µL), y sangre total de pacientes positivos recolectada en esa misma etapa; se observó una banda con migración retardada en el carril 2 y 4, indicativa de la formación de un complejo aptámero-proteína. Asimismo, se detectó la presencia de la banda correspondiente al aptámero libre. Este patrón sugiere una interacción parcial, posiblemente no saturante, bajo las condiciones experimentales evaluadas. El aptámero Pf_Mut (20 ng) mostró igualmente un retardo en la migración electroforética al ser incubado con los mismos pools proteicos utilizados previamente (Pf_SELEX, Pf_Nuevo y sangre total de pacientes positivos para *P. falciparum*), lo cual indica la formación de complejos aptámero-proteína. La similitud en el patrón de bandas con respecto al aptámero Pf sugiere que la mutación introducida no abolió la capacidad de interacción con los blancos proteicos. No obstante, se evidenció una menor intensidad en la banda desplazada correspondiente al complejo Pf_Mut-proteína, en comparación con la del aptámero Pf.

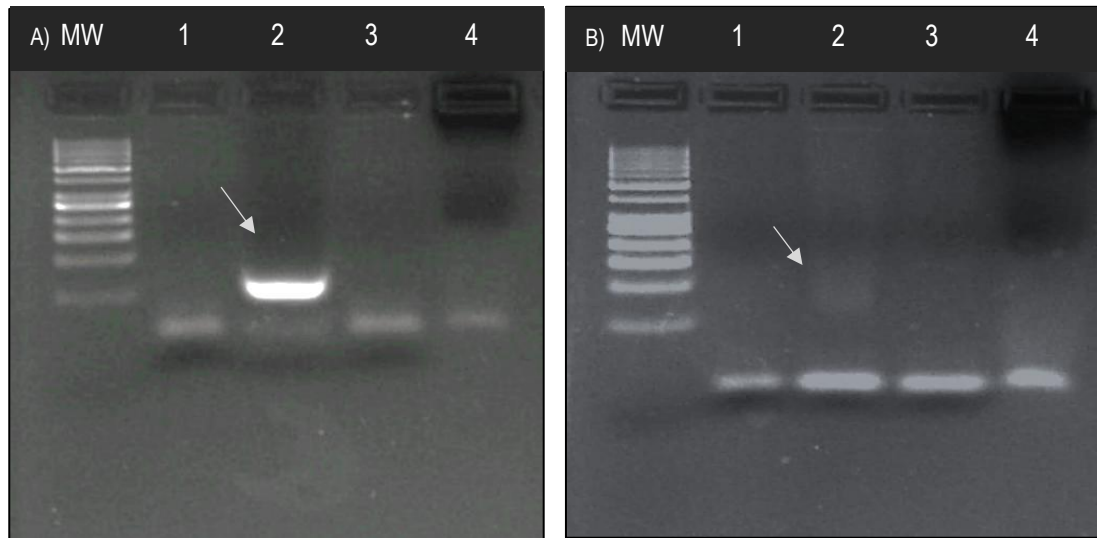


Figura 20. Ensayo EMSA para evaluar la interacción del aptámero Pf y su versión modular (Pf_Mut) con diferentes pools proteicos de *Plasmodium falciparum*.

(A) Aptámero Pf: las muestras fueron incubadas con (1) aptámero solo, (2) aptámero + Pool Pf_SELEX, (3) aptámero + Pool Pf_Nuevo y (4) aptámero + sangre total de pacientes positivos. (b) Aptámero Pf_Mut: las muestras fueron incubadas en el mismo orden de condiciones que el panel A. El complejo aptámero–proteína se evidencia por una banda de menor movilidad electroforética respecto al aptámero libre (indicada con flecha). MW: marcador de peso molecular (50–3000 pb). Corrida realizada en gel de agarosa al 2,5 % en tampón TB 0,5×, 100 V por 30 minutos.

Interacción del aptámero Pv y Pv_Mut con pools de *P. vivax*

Los ensayos EMSA realizados con los aptámeros Pv y Pv_Mut (20 ng) permitieron evaluar la formación de complejos aptámero–proteína frente a diferentes extractos de *Plasmodium vivax*. En ambos casos, se observaron bandas de menor movilidad electroforética en los carriles correspondientes a las incubaciones con el pool Pv_SELEX y con sangre total de pacientes positivos, lo que indica la interacción con componentes proteicos presentes en dichas muestras.

Para el aptámero Pv, las bandas desplazadas fueron evidentes en los carriles 1 y 3, lo que sugiere una interacción funcional con blancos moleculares en los extractos. No obstante, la persistencia de la banda del aptámero libre en todos los carriles indica una unión no saturante, posiblemente asociada a una afinidad intermedia o a la heterogeneidad de las proteínas presentes. En contraste, el aptámero Pv_Mut también mostró bandas desplazadas en condiciones similares, pero con una intensidad marcadamente menor, lo que sugiere que las mutaciones introducidas en la secuencia pudieron comprometer regiones estructuralmente importantes para el reconocimiento. Esta reducción en la señal podría atribuirse a una menor afinidad, a una alteración del plegamiento funcional del aptámero o a una menor estabilidad del complejo durante la electroforesis. En conjunto, los resultados sugieren que si bien Pv_Mut mantiene cierta capacidad de interacción, su eficiencia es inferior a la del aptámero original, lo que pone de relieve la sensibilidad del sistema de unión a modificaciones estructurales específicas.

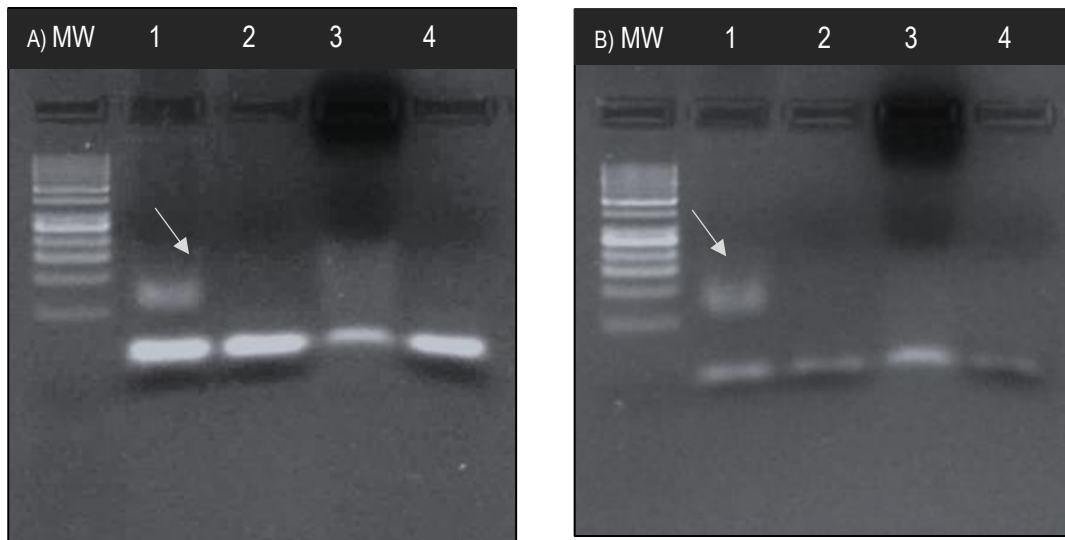


Figura 21. Ensayo EMSA para evaluar la interacción de los aptámeros Pv y Pv_Mut con extractos proteicos de *P. vivax*.

(A) Aptámero Pv: las muestras corresponden a (1) aptámero + Pool Pv_SELEX, (2) aptámero + Pool Pv_Nuevo, (3) aptámero + sangre total de pacientes positivos y (4) aptámero solo (control). B. Aptámero Pv_Mut: se utilizaron las mismas condiciones experimentales descritas para el panel A. En ambos casos, la presencia de bandas con menor movilidad electroforética (indicadas con flechas) corresponde presumiblemente a complejos aptámero-proteína. La coexistencia de bandas libres y desplazadas sugiere una interacción parcial bajo las condiciones evaluadas. MW: marcador de peso molecular (50–3000 pb). Corrida realizada en gel de agarosa al 2,5 % en tampón TB 0,5×, 100 V por 30 minutos.

Ensayo Pull-Down para validación de interacción aptámero-proteína

Con el objetivo de evaluar la capacidad de interacción específica entre los aptámeros seleccionados y proteínas diana de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, se realizaron ensayos tipo Pull-Down en condiciones controladas. Los aptámeros Pf y Pv, junto con sus versiones modulares (Pf_Mut y Pv_Mut), previamente acoplados a MNPs fueron incubados con pools de proteínas extraídas de pacientes infectados, y las proteínas capturadas fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE. A continuación, se presentan los resultados obtenidos, incluyendo el análisis de patrones de migración, comparación con controles negativos, y la observación preliminar de bandas específicas sugerentes de interacción molecular.

- Carril 2 (Pf + proteínas *P. falciparum*): se detectan tres bandas prominentes de ~ 55 kDa, ~ 76 kDa y ~ 95 kDa, ausentes en el control (carril 9).
- Carril 4 (Pf_Mut + proteínas): persiste únicamente la banda de ~ 76 kDa, con intensidad reducida.
- Carril 6 (Pv + proteínas *P. vivax*): aparecen dos bandas marcadas de ~ 55 kDa y ~ 75 kDa.
- Carril 8 (Pv_Mut + proteínas): las señales son prácticamente indetectables.

Estas diferencias refuerzan la especificidad de los aptámeros nativos y evidencian que las mutaciones introducidas comprometen la afinidad de unión, en concordancia con los resultados de EMSA. El peso molecular

aparente se estimó visualmente comparando con el marcador preteñido de 35–250 kDa; los valores reportados son aproximados.

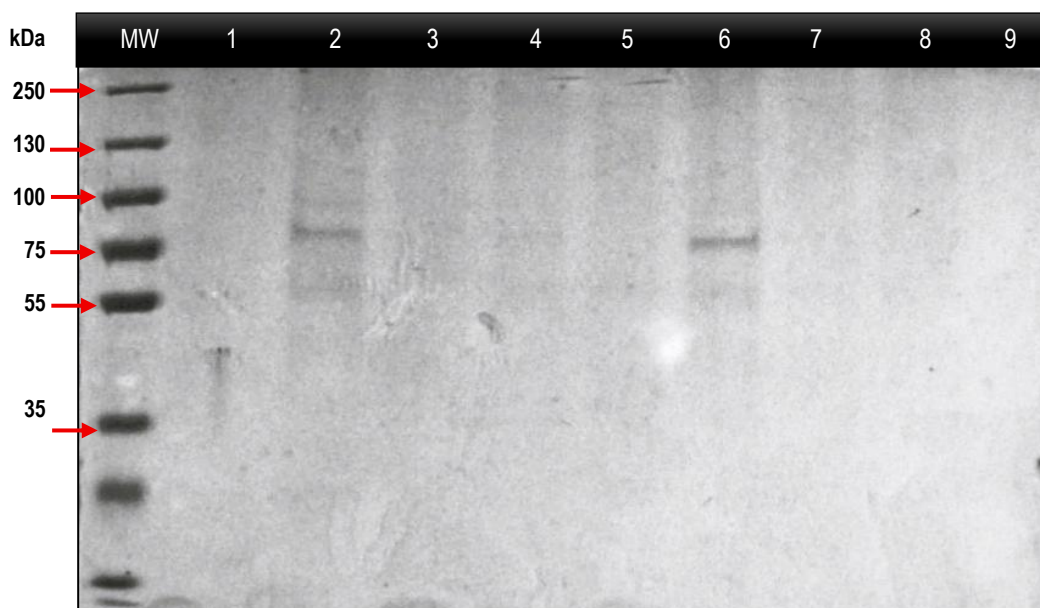


Figura 22. Ensayo Pull-Down para evaluar la interacción entre aptámeros y proteínas de *Plasmodium*. MW: marcador de peso molecular; carriles 1–2: **Apt Pf** sin y con proteínas de *P. falciparum*; carriles 3–4: **Apt Pf_Mut** sin y con proteínas; carriles 5–6: **Apt Pv** sin y con proteínas de *P. vivax*; carriles 7–8: **Apt Pv_Mut** sin y con proteínas; carril 9: control negativo (MNPs con proteínas, sin aptámetro). Las flechas indican las bandas diferenciales referidas en el texto. El tamaño aparente se calculó por comparación visual con el marcador (35–250 kDa).

Resultados del filtrado bioinformático por peso molecular

A partir del análisis de los proteomas completos de *Plasmodium falciparum* (5361 proteínas) y *Plasmodium vivax* (5438 proteínas), se aplicó un filtrado *in silico* basado en el peso molecular teórico de cada proteína. Este procedimiento se fundamentó en los patrones de migración observados experimentalmente en el gel SDS-PAGE del ensayo Pull-Down, donde las bandas retenidas se ubicaron en un rango estimado de 50 a 95 kDa. Con el fin de evitar la exclusión de proteínas debido a posibles anomalías en la migración electroforética, atribuibles a modificaciones postraduccionales o formación de complejos, se amplió el rango de selección ± 5 kDa y se organizaron los resultados en subrangos específicos. Los resultados se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Número de proteínas filtradas por rango de peso molecular en *P. falciparum* y *P. vivax*.

Rango (kDa)	N.º de proteínas en <i>P. falciparum</i>	N.º de proteínas en <i>P. vivax</i>
50–65	530	686
70–85	369	360
90–104	250	—
Total	1149	1046

Las proteínas seleccionadas fueron organizadas por subgrupo y documentadas en los Anexos 9 (*P. falciparum*) y 10 (*P. vivax*), donde se consignan sus identificadores UniProt, nombres originales y traducidos, secuencias en formato FASTA y peso molecular estimado. Este enfoque permitió reducir de forma significativa el número de posibles blancos de reconocimiento, facilitando su priorización para análisis posteriores mediante espectrometría de masas, modelado estructural o evaluación experimental.

Con el objetivo de focalizar aún más la búsqueda hacia proteínas de interés biomédico, se aplicó un segundo nivel de análisis orientado a identificar aquellas proteínas con respaldo en la literatura científica como antígenos vacunales, biomarcadores diagnósticos o blancos terapéuticos. Los resultados de esta priorización se presentan a continuación.

Tabla 7. Proteínas candidatas de interés biomédico identificadas en *P. falciparum* y *P. vivax*

Proteína	Peso (kDa)	Especie	UniProt ID	Aplicación	Referencia
AMA-1	83.2	<i>P. falciparum</i> / <i>P. vivax</i>	Q7K707 / A5K6N2	Vacuna	(120)
MSP-1	103.8	<i>P. falciparum</i> / <i>P. vivax</i>	P04933 / A5K6N6	Vacuna / Diagnóstico	(121)
CSP	42.0	<i>P. falciparum</i> / <i>P. vivax</i>	P14209 / A5K8V0	Vacuna	(122,123)
CyRPA	63.4	<i>P. falciparum</i>	Q8I2Q0	Vacuna	(124)
PvE140	81.6	<i>P. vivax</i>	A5K9Y2	Vacuna / Diagnóstico	(125)
Plasmepsin V	59.3	<i>P. falciparum</i>	Q8I5T5	Blanco terapéutico	(126)
TRAP	70.5	<i>P. falciparum</i>	Q76NM2	Vacuna (etapa pre-eritrocítica)	(127)
PfHSP70	72.6	<i>P. falciparum</i>	Q8II24	Blanco terapéutico; modulador del estrés	(128)
SUB1	82.3	<i>P. falciparum</i>	Q8I0V0	Inhibidores en desarrollo (eritrocitos)	(129)
PfEMP1 exón 2	94.7	<i>P. falciparum</i>	A0A143ZXL1	Diagnóstico molecular; variación antigénica	(130)
P47	65.2	<i>P. falciparum</i>	Q8IDN0	Transmisión sexual del parásito	(131)
Nucleoside transporter	50.1	<i>P. falciparum</i>	Q8I2A8	Blanco terapéutico	(132)
DMT1 putative	84.4	<i>P. falciparum</i>	Q8IBU2	Transporte fármaco/metabolito	(133)
VIR12 (y variantes múltiples)	52.3	<i>P. vivax</i>	A0A1Z1LVU6, A5KCU8, A5K697, A5K8H5, A5KCR2	Marcadores de exposición; antígenos de superficie exportados	(134)
VIR2 / PvLP2 / VIR24	66.8	<i>P. vivax</i>	—	Indicadores de exposición materna; correlacionan con infección natural	(135)

6. DISCUSIÓN

Caracterización inicial de las muestras y discrepancias diagnósticas

En este estudio, se reclutaron 48 pacientes provenientes de una región endémica para malaria en el Chocó, observándose una edad media de 38,7 años (IC 95 %: 33,4–44,0) y un leve predominio de hombres (54,2 %). Estos hallazgos coinciden con estudios realizados en otras regiones de Colombia. Por ejemplo, Knudson-Ospina et al. (2015), en Córdoba, reportaron una mayor proporción de casos en adultos jóvenes, con predominio masculino(136), al igual que lo observado en investigaciones en el Chocó por Hernández Sarmiento et al. (2020), donde se describió un comportamiento epidemiológico similar, particularmente en municipios con alta transmisión(137). De manera complementaria, Feged-Rivadeneira et al. observaron que la incidencia máxima en Colombia ocurre entre los 20 y 30 años, con una mayor frecuencia en hombres, atribuido principalmente a factores de exposición ocupacional y roles de movilidad en zonas endémicas(138). Este sesgo de género también se reflejó en estudios de la región del Darién, frontera entre Panamá y Colombia, donde la malaria afectó con mayor frecuencia a adultos jóvenes varones entre los 15 y 49 años (Cáceres-Carrera et al., 2019). En cuanto a los signos y síntomas clínicos, los más frecuentes en la población estudiada fueron fiebre (64,6 %), cefalea (60,4 %), escalofríos (43,8 %) y cansancio (41,7 %)(139). Este patrón sintomático es compatible con lo reportado en Córdoba (Knudson-Ospina et al., 2015), donde la malaria no complicada se manifestó predominantemente con fiebre y cefalea, y también con reportes clínicos en otras zonas del país, como Norte de Santander y el mismo Chocó.

Para definir los cuatro pools utilizados en el Bio-SELEX se aplicó: microscopía de gota gruesa, prueba rápida HRP2/LDH y PCR 18S anidada, a las 48 muestras recolectadas. La microscopía confirmó siete casos de malaria, la PCR coincidió en cuatro de ellos y la RDT detectó seis. El acuerdo observado entre microscopía, prueba rápida y PCR fue del 91,7% (44 de 48 muestras), con un índice de Kappa global de 0,735, lo que corresponde a una concordancia sustancial de acuerdo con la clasificación de Landis y Koch, lo que confirma la existencia de falsos negativos en las plataformas rápidas y moleculares. Con base en la concordancia final se establecieron cuatro categorías: Pf (n = 4), Pv (n = 3), CNE (n = 10) y CNNE (n = 31). Esta clasificación aseguró que las rondas negativas y positivas contaran con pools bien definidos para depurar secuencias inespecíficas y enriquecer aptámeros de interés.

Aun empleando métodos diagnósticos aceptados, varios pacientes positivos por microscopía resultaron negativos por RDT HRP2/LDH y, en algunos casos, por PCR. Todos ellos presentaban gametocitos circulantes, evidenciando una brecha entre la parasitemia observable y la sensibilidad de las herramientas antigénicas y moleculares. Cuando el parásito se encuentra mayoritariamente en forma de gametocitos maduros (estadios IV–V), la detección puede fallar: la proteína HRP2, blanco de la mayoría de las RDT, se expresa sobre todo en los estadios asexuales tempranos (0-48 h post-invasión) y disminuye drásticamente en los estadios sexuales avanzados, reduciendo la sensibilidad de la prueba(140).

Además, los gametocitos inmaduros se desarrollan principalmente en la médula ósea y alcanzan la sangre periférica solo cuando maduran, lo cual limita su acceso a las muestras convencionales(141). Incluso cuando los gametocitos maduros están en circulación, su detección por PCR puede verse comprometida por la menor cantidad de ADN nuclear respecto a las formas asexuales y por la diferencia en los genes transcritos activamente, ya que muchas PCR estándar amplifican regiones expresadas únicamente durante las fases asexuales del parásito(142,143). Estos hallazgos se alinean con estudios en Colombia como el de Cortés y Guerra (2020), en municipios endémicos, donde la concordancia entre RDT y microscopía fue moderada y sorprendentemente la sensibilidad de la microscopía superó a la PCR en detección de casos positivos(144).

Asimismo, evaluaciones locales de RDT tipo HRP2/pLDH mostraron sensibilidades altas (95 % con parasitemia ≥ 100 p/ μ L para *P. falciparum* y 99 % para *P. vivax*), pero con pérdida de sensibilidad por debajo de ese umbral y en casos con baja parasitemia o formas sexuales(145). Esta caracterización diagnóstica inicial proporcionó un punto de partida sólido para el Bio-SELEX, garantizando que los aptámeros se seleccionaran contra muestras correctamente clasificadas y que las rondas negativas incluyeran verdaderos controles endémicos y no endémicos libres de infección.

En conjunto, esta caracterización clínica y diagnóstica inicial permitió establecer criterios sólidos para la clasificación de las muestras en pools positivos y negativos. Esta clasificación fue esencial para aumentar la especificidad del Bio-SELEX, evitando la inclusión de muestras mal categorizadas que pudieran introducir ruido o secuencias inespecíficas. Así, el diseño experimental quedó mejor adaptado a las condiciones reales de los pacientes en contextos endémicos, mejorando la aplicabilidad de los aptámeros seleccionados.

Limitaciones logísticas y efectos en la sensibilidad

Es importante destacar que la logística y la recolección de las muestras se vieron afectadas por problemas de orden público, lo que impidió su traslado en los tiempos programados. Las carreteras sin pavimentar y las altas temperaturas de la región dificultaron mantener la cadena de frío. Estudios previos han demostrado que la viabilidad de *Plasmodium falciparum* en sangre refrigerada disminuye aproximadamente un 75 % durante las primeras 24 horas, y que, aunque los parásitos pueden seguir siendo visibles al microscopio hasta por 28 días, pierden completamente su capacidad de replicación después de 14 días, debido a la lisis celular y la degradación de estructuras internas del parásito(146). En consecuencia, el transporte de muestras en condiciones subóptimas reduce la carga parasitaria viable y, con ello, la sensibilidad tanto de la microscopía como de las pruebas diagnósticas observada en nuestro estudio.

Estas limitaciones reflejan escenarios reales en zonas de alta transmisión donde el diagnóstico oportuno es más difícil. El uso de estas muestras en el proceso de selección fortalece la relevancia práctica de los aptámeros generados, dado que fueron seleccionados frente a matrices clínicas que simulan las condiciones operativas de un entorno endémico.

Curva qPCR

Eficiencia de amplificación

Aun cuando la eficiencia calculada fue ≈ 72 %, es decir, inferior al umbral «ideal» del 90–110 %, tal como se evidencia en la figura. 11. Sin embargo, varios elementos avalan la solidez del ensayo. El coeficiente de correlación de la curva estándar alcanzó $R^2 = 0,990$, por encima del mínimo aceptado ($\geq 0,98$), lo que confirma una relación log-lineal robusta entre Ct y concentración. Además, las réplicas técnicas mostraron desviaciones estándar $< 0,25$ Ct en todas las rondas de selección, reflejando muy buena reproducibilidad(147). Es esencial subrayar que el análisis fue comparativo, no absoluto: nuestro objetivo era monitorizar el enriquecimiento relativo del *pool* ronda a ronda; por tanto, una eficiencia subóptima afecta por igual a todas las mediciones y no compromete la interpretación de ΔCt .

La literatura respalda este escenario. Kneißle et al. (2023) describieron el método IMPATIENT-qPCR y señalaron que la eficiencia puede verse lastrada por la complejidad estructural de las bibliotecas de aptámeros (bucles, G-cuádruplex) de modo que valores < 90 % son frecuentes en SELEX (148). Del mismo modo, Vorobyeva et al. (2022) advirtieron que la amplificación preferencial de secuencias sencillas o con menor

contenido de GC introduce sesgos y reduce la eficiencia aparente (149,150). Reconocer estas particularidades termodinámicas es clave para interpretar correctamente los datos del proceso SELEX.

Evolución de la T_m (Melt-curve)

Las curvas de disociación de los aptámeros seleccionados contra *P. vivax* mostraron, en todas las rondas positivas, dos picos bien definidos: uno constante a 66–68 °C y otro, dominante, a 80,0–80,5 °C, como se observó en la figura 13 y 15, respectivamente. En específico, *P. falciparum*: a partir de la ronda 6 el pico de baja T_m fue disminuyendo hasta desaparecer, mientras que el pico alto se estabilizó en 80 ± 0,5 °C. La desaparición de picos secundarios, combinada con ese desplazamiento ascendente de la T_m, indica que las secuencias no específicas (dímeros de cebadores/heterodúplex) fueron eliminadas y que el *pool* quedó dominado por estructuras homogéneas y ricas en GC, lo que se asocia con mayor afinidad(148,151). Mientras que, para *P. vivax*: en todas las rondas positivas persistieron dos picos: uno constante a 66–68 °C y otro a 80,0–80,5 °C. El pico alto refleja un subconjunto ya enriquecido; la supervivencia del pico bajo sugiere: presión selectiva más suave, mayor complejidad conformacional de los blancos o complejos menos estables que se liberan durante los lavados y vuelven a amplificarse.

Este comportamiento dual concuerda con la literatura: la T_m global suele subir conforme avanza la selección porque aumenta el contenido de GC y se depuran estructuras inestables; sin embargo, *pools* frente a blancos muy heterogéneos pueden retener una fracción de amplicones de baja T_m aun en rondas tardías(152).

Números de ciclos de detección

Diversos grupos han demostrado que la convergencia de la curva de fusión (Melt-curve) hacia un único pico de T_m elevada es un indicador fiable de que el *pool* de aptámeros se ha enriquecido en secuencias estructuralmente homogéneas y de mayor afinidad. En la metodología IMPATIENT-qPCR, por ejemplo, se correlacionó el incremento ronda a ronda de la T_m atribuido al aumento del contenido GC con el aumento de afinidad, y se recomendó detener la selección cuando el desplazamiento entre rondas fuese < 0,5 °C (148).

En el presente Bio-SELEX la selección positiva se interrumpió en la ronda 9 porque los parámetros cuantitativos mostraron que el enriquecimiento había alcanzado un punto de saturación. El descenso del Ct de moléculas unidas entre rondas fue < 0,3 ciclos y, considerando que la PCR operó con una eficiencia real de ≈ 72 %, esa diferencia representa un aumento < 1,25 veces en el número de copias, muy por debajo del umbral práctico (≥ 2-fold) que justificaría rondas adicionales, tal como se observa en la figura 12 y 14. A la vez, las curvas de disociación convergieron hacia un único pico dominante a 80 ± 0,5 °C, lo que evidencia homogeneidad estructural y sugiere que la mayoría de las secuencias comparten un mismo motivo de alta afinidad(153).

Varios autores subrayan que, a partir de la quinta-séptima ronda, la aparición de un solo pico alto y la desaparición de picos secundarios indican que los heterodúplexes y artefactos han sido depurados (109), permitiendo concluir el proceso sin riesgo de perder diversidad funcional(154). Continuar la amplificación bajo estas condiciones incrementa el riesgo de pérdida de diversidad y generación de artefactos sin mejorar la afinidad global, tal como advierten Stoltenburg et al. (111) y Blind & Blank (155). Además, las seis rondas negativas iniciales frente a albúmina/IgG y extractos de controles endémicos y no endémicos ya habían eliminado las secuencias con afinidad por proteínas humanas abundantes; rondas negativas adicionales habrían reducido aún más la diversidad funcional. En conjunto, la estabilización del ΔCt, la convergencia de la T_m y el equilibrio entre depuración y conservación de diversidad respaldan la decisión de detener el proceso tras 15 rondas totales.

Cabe señalar que la mayoría de los protocolos SELEX frente a proteínas recombinantes o complejas se detienen entre 8 y 12 rondas positivas; quedar dentro de este rango (ronda 9) evita el sesgo de sobre amplificación y mantiene la diversidad funcional.

Calidad de la biblioteca NGS y su pertinencia en Bio-SELEX

Se obtuvieron 401.473 lecturas en *P. falciparum* y 421.104 en *P. vivax* mediante secuenciación Illumina 2×250 pb. Tras el proceso de *trimming* y filtrado de calidad, se conservaron 141.593 y 152.808 secuencias válidas, lo que representó el 35,3 % y 36,2 % del total, respectivamente. Este rendimiento es comparable al reportado en experimentos HT-SELEX: Schütze et al. conservaron un 43 % de 13×10^6 lecturas útiles tras eliminar secuencias sin región aleatoria(156). e forma similar, Aschl (2021) documentó tasas de eliminación por *trimming* de adaptadores de entre 10 % y 11 %, además de pérdidas adicionales atribuibles a empalmes incorrectos o lecturas de baja calidad(157). Estos datos confirman que la depuración post-NGS representa una reducción sustancial del volumen bruto, sin comprometer la diversidad funcional de la biblioteca.

La inclusión de predicciones estructurales y análisis termodinámico de ΔG permitió seleccionar candidatos no solo por abundancia, sino también por estabilidad conformacional. Estudios recientes demuestran que esta integración de análisis de estructura secundaria mejora significativamente la probabilidad de identificar aptámeros funcionales(158), especialmente cuando se combinan métodos de frecuencia con predicción *in silico* de elementos estructurales como bucles internos, horquillas y tallos. Asimismo, se ha reportado que aptámeros con ΔG moderadamente bajos tienden a presentar un mejor balance entre estabilidad y especificidad, aunque la afinidad no depende exclusivamente del valor energético(159).

En conjunto, el volumen y calidad de la biblioteca obtenida permitieron realizar análisis de frecuencia, agrupamiento (*clustering*) y descubrimiento de motivos en consonancia con los estándares HT-SELEX. Además, se ha demostrado que la incorporación de NGS en SELEX supera ampliamente a la secuenciación Sanger al revelar aptámeros minoritarios de alta afinidad que de otro modo pasarían inadvertidos (160). Los motivos identificados guiaron el diseño racional de los aptámeros modulares Pf_Mut y Pv_Mut, que fueron posteriormente evaluados mediante EMSA y ensayos de *Pull-Down*, subrayando así la utilidad práctica de la depuración post-NGS para el desarrollo de candidatos diagnósticos robustos.

Aptámeros modulares

Diseño racional a partir de motivos bioinformáticos

La identificación de motivos nucleotídicos frecuentes se realizó con FASTAptamer, que analizó la biblioteca depurada por NGS y extrajo los diez *Motif* más abundantes. Esos *Motifs* sirvieron de insumo para el diseño racional de los aptámeros modulares Pf_Mut y Pv_Mut: una estrategia análoga a Motif-SELEX (161), que prioriza secuencias recurrentes para mejorar la afinidad, así como por modelos computacionales de alto rendimiento que optimizan aptámeros en función de datos enriquecidos(162).

En este contexto, los aptámeros modulares fueron diseñados integrando racionalmente los motivos seleccionados, siguiendo lineamientos descritos por Darmostuk et al. quienes destacan que la evolución reciente de la tecnología SELEX ha incorporado el análisis de motivos y el diseño modular como herramientas clave para mejorar la especificidad y la capacidad de unión(163). Varios trabajos han mostrado que esta optimización pos-SELEX reemplazar regiones variables por *Motif* recurrentes se traduce en un incremento medible de la afinidad y la eficiencia de reconocimiento puede traducirse en una mayor afinidad de unión y una mejor eficiencia en el reconocimiento molecular(164).

Evaluación funcional por EMSA

Los resultados obtenidos mediante EMSA con aptámeros modulares constituyen una validación funcional del protocolo Bio-SELEX. La presencia de bandas desplazadas en los extractos parasitarios indica que las secuencias seleccionadas conservan la capacidad de reconocer al menos una proteína diana, lo que respalda la eficacia del proceso de enriquecimiento, aun cuando la identidad molecular del blanco permanezca por determinar. La evaluación con versiones modulares de los aptámeros permitió analizar el impacto estructural de las modificaciones sobre su capacidad de interacción con los extractos proteicos. En los ensayos realizados con Pf_Mut y Pv_Mut se observaron bandas desplazadas indicativas de interacción aptámero-proteína, aunque con una intensidad visiblemente menor en comparación con los aptámeros nativos. Este hallazgo sugiere que las modificaciones no eliminaron completamente la capacidad de unión, pero sí pudieron haber afectado regiones estructuralmente relevantes para la estabilización del complejo, como ha sido documentado en estudios previos(165). La reducción en la intensidad de la señal podría atribuirse a una menor afinidad intrínseca, a alteraciones en la estructura secundaria o a una menor estabilidad del complejo durante la electroforesis(166).

Estos hallazgos coinciden con lo reportado por estudios recientes que han empleado aptámeros dirigidos contra proteínas de *Plasmodium*. Godonoga et al. (2016) utilizaron EMSA para validar un aptámero de ADN dirigido a una proteína de *P. falciparum*, observando un desplazamiento de banda que confirmó la formación del complejo aptámero-proteína(167). Pitolli et al. (2024), por su parte, diseñaron aptámeros de ARN contra la proteína tRip y también confirmaron su interacción mediante EMSA, reportando desplazamientos electroforéticos dependientes de la concentración del aptámero(168). En ambos estudios se emplearon proteínas purificadas, lo cual facilita la validación, pero no refleja las condiciones clínicas reales. Además, estudios como el de Cheung et al. (2018) emplearon EMSA como control de especificidad frente a proteínas humanas, lo cual respalda su utilidad no solo para confirmar interacción, sino también para descartar reactividad cruzada(169).

A diferencia de dichos trabajos, que utilizaron proteínas purificadas, el presente estudio empleó extractos proteicos clínicos mixtos, lo que representa un sistema más complejo pero más cercano a las condiciones reales de aplicación diagnóstica. La concordancia entre los resultados obtenidos y los reportados en la literatura refuerza la validez funcional de los aptámeros seleccionados y su potencial como herramienta diagnóstica en contextos clínicos.

Validación funcional en muestras clínicas distintas a las utilizadas en el Bio-SELEX

Con el fin de evaluar la aplicabilidad de los aptámeros seleccionados en un contexto clínico real, se realizaron ensayos EMSA utilizando pools de muestras clínicas distintas a las empleadas durante el proceso de Bio-SELEX. Estas muestras provenían de pacientes con diagnóstico confirmado de malaria por *P. falciparum* o *P. vivax*, recolectadas en el marco de la Fase II del estudio, y representan un entorno proteico heterogéneo y biológicamente relevante.

A pesar de la complejidad de la matriz biológica, que incluye proteínas humanas en altas concentraciones y potenciales interferentes, se observó un leve pero reproducible retardo en la migración de las bandas tras la incubación con los aptámeros nativos. Este fenómeno sugiere la formación de complejos aptámero-proteína con componentes presentes en las muestras clínicas, lo que podría indicar que los aptámeros conservan su capacidad de reconocimiento en un entorno distinto al que fueron seleccionados inicialmente. La menor intensidad observada en comparación con los pools de sangre total de pacientes infectados puede atribuirse a varios factores: menor concentración del blanco molecular, presencia de isoformas no coincidentes, interferencia de proteínas del hospedero o competencia por unión no específica. Sin embargo, estos resultados

aportan evidencia funcional de que los aptámeros son capaces de reconocer proteínas nativas incluso cuando están inmersas en una matriz clínica compleja.

Validación de la interacción aptámero-proteína mediante ensayo Pull-Down

Los resultados del ensayo Pull-Down corroboraron la capacidad de unión selectiva de los aptámeros nativos (Pf y Pv) hacia proteínas presentes en muestras clínicas de malaria. La retención de bandas distinguibles en el rango de ~50–95 kDa, ausentes en los controles y en algunos de los aptámeros modulares, sugiere que la interacción está mediada por la integridad estructural y funcional del aptámero. La aparición de múltiples bandas en cada carril plantea dos escenarios no excluyentes: por un lado, los aptámeros podrían reconocer más de una proteína con epítomos estructurales convergentes; por otro, podrían estar detectando isoformas o variantes postraduccionales de una misma proteína, como ocurre con frecuencia en las etapas sanguíneas de *Plasmodium* spp., donde son comunes fenómenos como la fosforilación, glicosilación o el clivaje limitado(170). Esta heterogeneidad molecular, lejos de ser una limitante, ofrece la ventaja de capturar un repertorio más amplio de biomarcadores circulantes, aumentando la cobertura del sistema de detección.

Estos hallazgos constituyen la base de la siguiente fase del estudio: identificar las proteínas capturadas mediante espectrometría de masas (LC MS/MS), con el propósito de validar su potencial como blancos diagnósticos o terapéuticos. Para restringir el universo de posibles dianas reconocidas en el ensayo Pull Down, se aplicó una estrategia de filtrado bioinformático sobre los proteomas completos de *P. falciparum* y *P. vivax*, considerando exclusivamente aquellas proteínas cuyo peso molecular teórico coincidía con los rangos observados experimentalmente. Estos intervalos fueron establecidos a partir del análisis visual del SDS PAGE y ampliados en ± 5 kDa, con el objetivo de incluir proteínas que pudieran presentar migración anómala debido a modificaciones postraduccionales o a la formación de complejos estables(171,172).

or otro lado, el Pull Down realizado con los aptámeros modulares (Pf_Mut y Pv_Mut) evidenció una reducción drástica en la cantidad y la intensidad de las bandas recuperadas. Este comportamiento, concordante con los resultados del EMSA, sugiere que los nucleótidos sustituidos participan directamente en la interfaz de reconocimiento con la proteína blanco. No obstante, la presencia residual de señal indica que otros elementos estructurales del aptámero, como bucles, horquillas o motivos secundarios, continúan contribuyendo a la interacción, aunque con menor afinidad. Estos hallazgos respaldan el uso de mutagénesis dirigida como herramienta para mapear regiones funcionales críticas y optimizar la afinidad y especificidad de los aptámeros, tanto para aplicaciones diagnósticas como terapéuticas.

Diversos estudios han demostrado que los aptámeros pueden emplearse con éxito como herramientas de captura específica en estrategias de Pull-Down acopladas a nanopartículas, incluso en contextos biológicos altamente complejos. Por ejemplo, Kim et al. (2014) reportaron el uso de aptámeros conjugados a esferas magnéticas funcionalizadas para la captura y enriquecimiento de proteínas blanco en fluidos humanos, seguidos de su identificación mediante espectrometría de masas(173). Estos antecedentes respaldan la aplicabilidad del uso de aptámeros como elementos de afinidad en metodologías Pull-Down dirigidas, y permiten extrapolar con fundamento su uso en contextos infecciosos, como el de la malaria. En este sentido, la implementación de aptámeros seleccionados contra *P. falciparum* y *P. vivax*, acoplados a matrices sólidas, se presenta como una herramienta promisoriosa para capturar proteínas expresadas por el parásito directamente desde lisados celulares o matrices clínicas. La combinación de aptámeros con nanopartículas funcionalizadas no solo ofrece ventajas en cuanto a especificidad y estabilidad, sino que representa una alternativa robusta y reproducible para el descubrimiento de biomarcadores relevantes, con aplicaciones potenciales tanto en el diagnóstico precoz como en la validación de nuevos blancos terapéuticos.

Priorización *in silico* de candidatos proteicos

El filtrado bioinformático aplicado a los proteomas completos de *Plasmodium falciparum* y *P. vivax* permitió reducir de manera significativa el número de posibles proteínas diana reconocidas por los aptámeros seleccionados en el ensayo Pull-Down. De un total de 5361 proteínas en *P. falciparum* y 5438 en *P. vivax*, se seleccionaron 1149 y 1046 proteínas, respectivamente, cuyos pesos moleculares teóricos se encontraban dentro de los rangos observados experimentalmente (50–65, 70–85 y 90–104 kDa).

Este enfoque de preselección por peso molecular es ampliamente utilizado en estudios de proteómica dirigida y validación de interacciones moleculares, especialmente cuando se parte de mezclas complejas sin información previa sobre los blancos moleculares(174). La organización de las proteínas candidatas por subrango facilita su priorización en los análisis posteriores por espectrometría de masas (LC-MS/MS), y permite establecer correspondencias más objetivas entre los patrones de bandas observados en el gel y las posibles identidades proteicas. En ambos proteomas, el mayor número de proteínas candidatas se concentró en el rango de 50–65 kDa, lo cual puede atribuirse tanto a la distribución natural del peso de las proteínas codificadas en *Plasmodium*, como a una posible preferencia estructural de los aptámeros por blancos de tamaño intermedio(175). Sin embargo, esta estrategia presenta limitaciones inherentes: el peso molecular estimado por SDS-PAGE puede diferir del valor teórico debido a múltiples factores, entre ellos modificaciones postraduccionales (como fosforilación, glicosilación o clivaje proteolítico), migración anómala o formación de complejos estables(171,176). En este sentido, la revisión de Doerig et al. (168) evidencia que las modificaciones postraduccionales en *Plasmodium* alteran significativamente la migración electroforética en SDS-PAGE, lo cual justifica la ampliación de ± 5 kDa aplicada en el presente estudio.

Adicionalmente, como lo señalaron Wuchty et al. (2007), los mapas de interacción proteica existentes no cubren de manera exhaustiva el proteoma completo, lo que refuerza la necesidad de implementar estrategias de depuración sistemática como la aquí utilizada, con el fin de identificar dianas moleculares emergentes en estudios proteómicos dirigidos(177).

Tras este primer nivel de filtrado, se aplicó un segundo criterio de priorización basado en la relevancia biomédica de las proteínas seleccionadas. Mediante un análisis cruzado con bases de datos especializadas (UniProtKB, PubMed, PlasmoDB, IEDB y PDB), se identificaron proteínas con respaldo experimental como antígenos vacunales, biomarcadores diagnósticos o blancos terapéuticos. Entre las proteínas priorizadas destacaron AMA-1, CSP, MSP-1, CyRPA, PvE140, Plasmepsina V y PfMDR1, todas ellas con documentación científica que respalda su participación en mecanismos clave del ciclo del parásito y su evaluación en ensayos clínicos o preclínicos. Además, se incorporaron proteínas adicionales como TRAP, PfHSP70, SUB1, PfEMP1, P47 y transportadores implicados en resistencia a fármacos, las cuales también se encuentran dentro de los rangos de peso establecidos y fueron detectadas en el subconjunto filtrado.

La integración de ambos niveles de análisis permite no solo optimizar el proceso de identificación mediante LC-MS/MS, sino también dirigir la atención hacia proteínas con mayor probabilidad de implicación biológica y utilidad en fases posteriores del estudio, como el modelado estructural, el diseño de epítomos o la validación inmunológica.

En conjunto, estos resultados validan la hipótesis central de este trabajo: los aptámeros seleccionados mediante Bio-SELEX son capaces de reconocer proteínas relevantes presentes en muestras clínicas de malaria y capturarlas de manera específica a través ensayos tipo Pull-Down. La integración de este enfoque experimental con herramientas de filtrado bioinformático por peso molecular y relevancia biomédica no solo permitió reducir

el universo de análisis, sino también anticipar con mayor precisión las posibles identidades de las proteínas retenidas. Este enfoque estratégico da cumplimiento al segundo objetivo específico de la investigación y habilita la siguiente fase del estudio: la caracterización por espectrometría de masas (LC-MS/MS) de los complejos proteína-aptámero. Se espera que esta caracterización confirme la presencia de proteínas con funciones clave en la biología del parásito y valor diagnóstico o terapéutico comprobado, lo cual consolidaría el uso de aptámeros como herramientas prometedoras en el desarrollo de plataformas de detección o intervención contra la malaria.

7. CONCLUSIONES

Este estudio demostró que la aplicación de la estrategia Bio-SELEX sobre extractos proteicos de sangre total de pacientes infectados con *P. falciparum* y *P. vivax*, lo cual permitió seleccionar varios aptámeros con capacidad de interacción específica hacia componentes presentes en dichos extractos. La validación funcional mediante EMSA y Pull-Down confirmó la afinidad del aptámero por al menos una proteína, respaldando la eficacia del proceso de selección.

Aunque no fue posible identificar directamente el blanco molecular mediante espectrometría de masas, el filtrado bioinformático basado en el peso molecular permitió proponer candidatos teóricos. Estos resultados constituyen una validación funcional preliminar y demuestran el potencial del enfoque Bio-SELEX para el desarrollo de herramientas diagnósticas.

En conjunto, esta investigación sienta una base sólida para el uso de aptámeros en contextos clínicos, especialmente en el diseño de plataformas adaptables a territorios con recursos limitados.

Cabe destacar que este trabajo forma parte de un macroproyecto de investigación más amplio, el cual contempla la realización de estudios de identificación proteica mediante espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC-MS/MS). Esta fase futura será determinante para validar la especificidad de los blancos moleculares, confirmar su relevancia diagnóstica y guiar la optimización de los aptámeros obtenidos.

Por tanto, los resultados aquí presentados deben entenderse como una validación funcional preliminar, útil para sustentar futuras etapas de desarrollo. El uso de extractos nativos en la selección y en los ensayos funcionales otorga valor biológico y aplicabilidad clínica al modelo, pero también impone desafíos en cuanto a la interpretación precisa del blanco molecular.

LIMITACIONES

A lo largo del desarrollo de esta investigación, se reconocieron diversas limitaciones técnicas, logísticas y metodológicas que deben considerarse al interpretar los resultados obtenidos:

1. Posible reacción cruzada entre especies del género *Plasmodium* spp.

Aunque se realizaron seis rondas negativas utilizando albúmina e IgG humanas, muestras de individuos no infectados de zonas endémicas, y extractos del *Plasmodium* alterno, no puede descartarse por completo la reactividad cruzada a nivel de género. Estas rondas eliminan secuencias con afinidad por epítomos comunes o inmunodominantes, pero no garantizan que los aptámeros seleccionados reconozcan exclusivamente antígenos especie-específicos. Es posible que algunos aptámeros se dirijan a proteínas conservadas del género, como chaperonas o enzimas metabólicas esenciales. Esta hipótesis se ve respaldada por la atenuación parcial de la señal en aptámeros modulares y la presencia de múltiples bandas en los ensayos de Pull-Down. Futuros análisis de especificidad cruzada con otras especies de *Plasmodium* e incluso con patógenos febriles prevalentes (como dengue o leishmaniasis) serán clave para validar la especificidad diagnóstica.

2. Ausencia de identificación proteica por espectrometría de masas (LC-MS/MS)

Si bien los ensayos Pull-Down permitieron capturar proteínas a partir de extractos nativos y se aplicaron filtros bioinformáticos por peso molecular, no se logró identificar las proteínas blanco mediante espectrometría de masas. Esta carencia limita la capacidad de determinar la identidad y función de los blancos moleculares reconocidos por los aptámeros, y por tanto, su especificidad real como biomarcadores. La posterior identificación por LC-MS/MS de las bandas ya capturadas permitirá esclarecer si los blancos son genuinamente especie-específicos o corresponden a proteínas conservadas del género. En caso de comprobarse reactividad cruzada, el panel de aptámeros podrá refinarse mediante rondas negativas adicionales dirigidas al ortólogo no deseado, o mediante ingeniería molecular para mejorar la discriminación fina entre isoformas.

3. Condiciones logísticas adversas en la recolección de muestras clínicas

La obtención de muestras en zonas rurales del Chocó enfrentó múltiples desafíos: accesos limitados, poca disponibilidad del personal de salud, temperaturas ambientales elevadas y problemas de orden público. Estas condiciones dificultaron el mantenimiento estricto de la cadena de frío y pudieron comprometer la integridad de las muestras biológicas, afectando la calidad de los extractos proteicos y, posiblemente, la sensibilidad diagnóstica de los ensayos. Para futuras fases del proyecto, se recomienda el fortalecimiento de alianzas con instituciones locales y la implementación de estrategias logísticas alternativas.

4. Falta de validación diagnóstica cuantitativa

Aunque los ensayos funcionales cualitativos (EMSA y Pull-Down) evidenciaron interacciones aptámero–blanco, no se realizaron pruebas diagnósticas cuantitativas estandarizadas que permitieran determinar sensibilidad, especificidad, límites de detección (LOD) o valores predictivos bajo condiciones clínicas simuladas. Será necesario desarrollar en fases futuras plataformas tipo ELONA, sensores electroquímicos o pruebas de flujo lateral para evaluar el rendimiento de los aptámeros en cohortes representativas y establecer su utilidad diagnóstica real.

PERSPECTIVAS

Este trabajo representa un paso inicial en la validación funcional, a escala de laboratorio, de un aptámero obtenido mediante la estrategia Bio-SELEX contra extractos proteicos de *P. falciparum* y *P. vivax*. Aunque los resultados obtenidos son preliminares, permiten visualizar el potencial de estos aptámeros como herramientas diagnósticas, resaltando la necesidad de continuar con el desarrollo y optimización de los ensayos empleados.

Los experimentos funcionales realizados, aportan evidencia complementaria sobre la capacidad del aptámero para interactuar con componentes del extracto proteico. En particular, el EMSA mostró un cambio en la movilidad electroforética del aptámero, lo que indica una interacción molecular capaz de modificar su estructura secundaria, apoyando la hipótesis de unión específica. Por su parte, el ensayo de Pull-Down evidenció la retención de proteínas por parte del aptámero, reforzando su funcionalidad. Si bien no se realizó espectrometría de masas para la identificación directa de estas proteínas, se aplicó un filtrado bioinformático basado en el peso molecular de las bandas obtenidas, lo cual permitió proponer candidatos proteicos preliminares dentro del rango esperado. Estos hallazgos permiten concluir que el aptámero presenta afinidad por al menos un componente del extracto total de proteínas, validando funcionalmente el principio del Bio-SELEX aplicado. El uso del extracto completo como blanco durante el proceso de selección favoreció la obtención de aptámeros capaces de reconocer antígenos nativos en condiciones cercanas al entorno clínico real.

Sin embargo, este estudio constituye apenas una validación funcional inicial. Para avanzar hacia el desarrollo de una prueba diagnóstica robusta, específica y clínicamente aplicable basada en aptámeros, será necesario realizar estudios complementarios que incluyan:

- Identificación de los blancos moleculares mediante técnicas de LC-MS/MS, lo cual permitirá confirmar la identidad y función de las proteínas reconocidas y evaluar su especificidad a nivel de especie.
- Evaluación de especificidad cruzada frente a otras especies de *Plasmodium* y enfermedades febriles frecuentes en zonas endémicas, como dengue, leishmaniasis o Chikungunya.
- Medición de parámetros diagnósticos clave, tales como sensibilidad, especificidad, constantes de disociación (K_d) y límites de detección.
- Desarrollo de plataformas diagnósticas de campo, como biosensores electroquímicos o sistemas de flujo lateral, que permitan una detección rápida, portátil y de bajo costo.
- Análisis de estabilidad del aptámero, para asegurar su funcionalidad en condiciones ambientales diversas y durante el almacenamiento prolongado.

Además, la estrategia utilizada en este trabajo podría extrapolarse a otros patógenos de interés en salud pública en Colombia, ampliando el uso de Bio-SELEX como una herramienta versátil para el desarrollo de tecnologías diagnósticas basadas en aptámeros. En resumen, aunque aún quedan múltiples etapas por desarrollar, los resultados obtenidos sientan una base sólida para continuar explorando el uso de aptámeros como componentes clave en el diseño de herramientas diagnósticas innovadoras, específicas y adaptadas al contexto local.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

El protocolo de investigación fue evaluado y aprobado por el Comité de Bioética del Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT) en su sesión del 25 de abril de 2024 (Acta No. 91). La carta de aval, fechada el 22 de mayo de 2024, clasifica el estudio como de riesgo mínimo conforme a la Resolución 8430/1993 del Ministerio de Salud de Colombia. Véase Anexo 4.

El estudio se desarrolló conforme a los principios éticos establecidos en la Resolución 008430 de 1993 (Título II, Capítulo I), normativa que regula la investigación con seres humanos en Colombia. Se respetó en todo momento la dignidad, los derechos y el bienestar de los participantes, preservando su privacidad.

De acuerdo con la clasificación de la resolución, la investigación se consideró de riesgo mínimo, ya que solo implicó la obtención de dos muestras de sangre venosa (una en tubo seco y otra en tubo con anticoagulante) y una muestra de punción capilar. Todas las tomas fueron realizadas por un profesional en bacteriología capacitado, en un laboratorio clínico del departamento del Chocó, y posteriormente se enviaron al laboratorio ICMT-CES en Sabaneta (Antioquia) para su procesamiento.

Previamente a su inclusión, todos los participantes firmaron un consentimiento informado en el que se especificaron la justificación y los objetivos del estudio, los procedimientos a realizar y su derecho a retirarse en cualquier momento sin repercusiones. El documento contó con la aprobación del Comité de Ética en Investigación Biomédica de la Universidad CES (Acta 91-2024, 18 de abril de 2024).

Para garantizar la confidencialidad de los datos se implementaron las siguientes medidas:

1. Los registros se almacenaron en servidores seguros con acceso restringido exclusivamente al equipo de investigación autorizado.
2. A cada participante se le asignó un código alfanumérico, evitando el uso de nombres u otros identificadores directos.
3. Se utilizaron protocolos cifrados para la transmisión y el almacenamiento de la base de datos, protegiéndola frente a accesos no autorizados o pérdidas accidentales.
4. Todo el personal implicado firmó acuerdos de confidencialidad y recibió capacitación específica sobre la protección de la información, en cumplimiento de la Ley 1581/2012 de protección de datos personales.

Estas acciones aseguraron el cumplimiento estricto de las normas éticas y legales vigentes durante la ejecución del estudio.

REACTIVOS

- Buffer TBE 1X (0,89 M Tris, 0,89 M ácido bórico, 20 mM EDTA, pH 8,3)
- Buffer TB 0,5x (Tris base 44,6 mM, 45,3 mM ácido bórico, pH 8,4 ajustado con HCl)
- Buffer PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4)
- Buffer Carbonato- Bicarbonato (pH 9.6, 1.59 g Na₂CO₃, 2.93 g NaHCO₃)
- Buffer Selex (pH 7.4 PBS 1x, 2.5 mM de MgCL2, Tween20 al 0.02%)
- Buffer de corrida SDS-PAGE (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1 % SDS, pH 8,3)
- Buffer MES compuesto por 10 mM MES, 75 mM NaCl y 25 mM CaCl₂ anhidro.
- Pierce™ Albumin/IgG Removal Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 89875).
- *Laemmli Sample Buffer*, Bio-Rad, Cat. No. 161-0732
- Marcador de peso molecular *Thermo Scientific™ GeneRuler 50 bp DNA Ladder* (Cat. No. SM0371).
- *Hydragreen™ Safe DNA Dye* (ACTGene™, 20 000x, Cat. No. HYD001).
- Loading Dye) Azul 6X (SMOBIO, Cat. No. TP1110)
- OneTaq® 2X Máster Mix with Standard Buffer (New England Biolabs)
- Transiluminador Labnet ENDURO™ GDS (Model # GDS2-1365).
- Azul de Commassie R-250 BioRad
- Gradilla magnética
- Agitador orbital

BIBLIOGRAFÍA

1. Sato S. Plasmodium-a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *J Physiol Anthropol*. 2021 Jan 7;40(1):1.
2. World malaria report 2022 [Internet]. [cited 2023 Oct 20]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240064898>
3. World Health Organization. World Malaria report 2024 [Internet]. Geneva: World Health Organization; [cited 2025 May 26]. Report No.: ISBN 978-92-4-010444-0. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240104440>
4. Colonia CB, Vásquez-Rodríguez AB, Alexander N, de la Hoz Restrepo F. Malaria, relationship with climatic variables and deforestation in Colombia, Latin America and the Caribbean from 2000 to 2020: a systematic review. *Malar J*. 2024 Nov 18;23:347.
5. 2025_Boletin_epidemiologico_semana_28.pdf [Internet]. [cited 2025 Aug 7]. Available from: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2025_Boletin_epidemiologico_semana_28.pdf
6. Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderón GI, Quiñones ML, Ruiz-López F, Wilkerson RC, et al. Malaria vector species in Colombia: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Aug;106:223–38.
7. Jang JW, Cho CH, Han ET, An SSA, Lim CS. pLDH level of clinically isolated Plasmodium vivax and detection limit of pLDH based malaria rapid diagnostic test. *Malar J*. 2013 June 3;12(1):181.
8. Mendoza N, Cucunubá ZM, Aponte S, González N, Bernal S. Evaluación de campo de la precisión diagnóstica de la prueba de diagnóstico rápido SD Bioline Malaria Antigen Pf/Pv® en Colombia. *Biomédica*. 2013 May 27;33.
9. Agarwal R, Choi L, Johnson S, Takwoingi Y. Rapid diagnostic tests for *Plasmodium vivax* malaria in endemic countries. Cochrane Infectious Diseases Group, editor. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2020 Nov 4 [cited 2023 Oct 26];2020(11). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD013218.pub2>
10. Solano CM, Okoth SA, Abdallah JF, Pava Z, Dorado E, Incardona S, et al. Deletion of Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein 2 (pfhrp2) and Histidine-Rich Protein 3 (pfhrp3) Genes in Colombian Parasites. *PLOS ONE*. 2015 July 7;10(7):e0131576.
11. van den Broek I, Hill O, Gordillo F, Angarita B, Hamade P, Counihan H, et al. Evaluation of three rapid tests for diagnosis of P. falciparum and P. vivax malaria in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Dec;75(6):1209–15.
12. Amexo M, Tolhurst R, Barnish G, Bates I. Malaria misdiagnosis: effects on the poor and vulnerable. *The Lancet*. 2004 Nov 20;364(9448):1896–8.
13. Duong MC, Pham OKN, Nguyen PT, Nguyen VVC, Nguyen PH. Predictors of treatment failures of plasmodium falciparum malaria in Vietnam: a 4-year single-centre retrospective study. *Malar J*. 2021 Apr 29;20(1):205.
14. Juliano JJ, Arie F, Sem R, Tangpukdee N, Krudsood S, Olson C, et al. Misclassification of Drug Failure in Plasmodium falciparum Clinical Trials in Southeast Asia. *J Infect Dis*. 2009 Aug 1;200(4):624–8.

15. Govere J, Durrheim D, Grange K la, Mabuza A, Booman M. Community knowledge and perceptions about malaria and practices influencing malaria control in Mpumalanga province, South Africa. *S Afr Med J*. 2000;90(6):611–8.
16. MOST H, MELENEY HE. FALCIPARUM MALARIA: THE IMPORTANCE OF EARLY DIAGNOSIS AND ADEQUATE TREATMENT. *J Am Med Assoc*. 1944 Jan 8;124(2):71–6.
17. Mayer G. The chemical biology of aptamers. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009;48(15):2672–89.
18. Song KM, Lee S, Ban C. Aptamers and Their Biological Applications. *Sensors*. 2012 Jan;12(1):612–31.
19. Jayasena SD. Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics. *Clin Chem*. 1999 Sept 1;45(9):1628–50.
20. Ospina J, V RC, Sánchez-Jiménez MM. Bio-SELEX: A new strategy to identify new biomarkers from biological samples [Internet]. Preprints; 2023 May [cited 2023 Oct 25]. Available from: <https://www.authorea.com/users/618715/articles/643817-bio-selex-a-new-strategy-to-identify-new-biomarkers-from-biological-samples?commit=a851e1e40b38d8393a8254c2c00e24da41c78626>
21. Phillips JA, Lopez-Colon D, Zhu Z, Xu Y, Tan W. Applications of aptamers in cancer cell biology. *Anal Chim Acta*. 2008 July;621(2):101–8.
22. Mi J, Liu Y, Rabbani ZN, Yang Z, Urban JH, Sullenger BA, et al. In vivo selection of tumor-targeting RNA motifs. *Nat Chem Biol*. 2010 Jan;6(1):22–4.
23. Shangguan D, Meng L, Cao ZC, Xiao Z, Fang X, Li Y, et al. Identification of Liver Cancer-Specific Aptamers Using Whole Live Cells. *Anal Chem*. 2008 Feb 1;80(3):721–8.
24. Goh KW, Stephen A, Wu YS, Sim MS, Batumalaie K, Gopinath SCB, et al. Molecular Targets of Aptamers in Gastrointestinal Cancers: Cancer Detection, Therapeutic Applications, and Associated Mechanisms. *J Cancer*. 2023 Aug 6;14(13):2491–516.
25. Ni S, Yao H, Wang L, Lu J, Jiang F, Lu A, et al. Chemical Modifications of Nucleic Acid Aptamers for Therapeutic Purposes. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug;18(8):1683.
26. Pan Q, Luo F, Liu M, Zhang XL. Oligonucleotide aptamers: promising and powerful diagnostic and therapeutic tools for infectious diseases. *J Infect*. 2018 Aug 1;77(2):83–98.
27. Ilgu M, Fazlioglu R, Ozturk M, Nilsen-Hamilton YO and M, Ilgu M, Fazlioglu R, et al. Aptamers for Diagnostics with Applications for Infectious Diseases. In: *Recent Advances in Analytical Chemistry* [Internet]. IntechOpen; 2019 [cited 2024 May 26]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/66038>
28. Frezza V, Pinto-Díez C, Fernández G, Soto M, Martín ME, García-Sacristán A, et al. DNA aptamers targeting *Leishmania infantum* H3 protein as potential diagnostic tools. *Anal Chim Acta*. 2020 Apr 22;1107:155–63.
29. Ospina Villa J, Osorio M, Caraballo Guzmán A, Sánchez-Jiménez M. Isolation of DNA aptamers as a potential tool for Leishmaniasis diagnosis. 2022 Feb 16;0–00.

30. Ospina-Villa JD, Dufour A, Weber C, Ramirez-Moreno E, Zamorano-Carrillo A, Guillen N, et al. Targeting the polyadenylation factor EhCFIm25 with RNA aptamers controls survival in *Entamoeba histolytica*. *Sci Rep*. 2018 Apr 9;8(1):5720.
31. Royero-Bermeo WY, Sánchez-Jiménez MM, Ospina-Villa JD. Aptamers as innovative tools for malaria diagnosis and treatment: advances and future perspectives. *Biol Methods Protoc*. 2025 Jan 1;10(1):bpaf025.
32. Taylor AR, Echeverry DF, Anderson TJC, Neafsey DE, Buckee CO. Identity-by-descent with uncertainty characterises connectivity of *Plasmodium falciparum* populations on the Colombian-Pacific coast. *PLOS Genet*. 2020 Nov 16;16(11):e1009101.
33. Garzón-Ospina D, López C, Forero-Rodríguez J, Patarroyo MA. Genetic diversity and selection in three *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 7 (Pvmsp-7) genes in a Colombian population. *PloS One*. 2012;7(9):e45962.
34. Dorado EJ, Okoth SA, Montenegro LM, Diaz G, Barnwell JW, Udhayakumar V, et al. Genetic Characterisation of *Plasmodium falciparum* Isolates with Deletion of the pfrp2 and/or pfrp3 Genes in Colombia: The Amazon Region, a Challenge for Malaria Diagnosis and Control. *PLoS ONE*. 2016 Sept 16;11(9):e0163137.
35. Gopinath SCB. Methods developed for SELEX. *Anal Bioanal Chem*. 2007 Jan 1;387(1):171–82.
36. Ospina JD. Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología. *Biomédica*. 2020 May 1;40(Supl. 1):148–65.
37. Paludismo [Internet]. [cited 2023 Nov 9]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
38. Mehra S, McCaw JM, Taylor PG. Superinfection and the hypnozoite reservoir for *Plasmodium vivax*: a general framework. *J Math Biol*. 2023 Dec 1;88(1):7.
39. Montiel J, Zuluaga LM, Aguirre DC, Segura C, Tobon-Castaño A, Vásquez AM. Microscopic and submicroscopic *Plasmodium* infections in indigenous and non-indigenous communities in Colombia. *Malar J*. 2020 Apr 16;19(1):157.
40. Colonia CB, Vásquez-Rodríguez AB, Alexander N, de la Hoz Restrepo F. Malaria, relationship with climatic variables and deforestation in Colombia, Latin America and the Caribbean from 2000 to 2020: a systematic review. *Malar J*. 2024 Nov 18;23(1):347.
41. 2025_Boletin_epidemiologico_semana_25.pdf [Internet]. [cited 2025 June 29]. Available from: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2025_Boletin_epidemiologico_semana_25.pdf
42. Weiss DJ, Lucas TCD, Nguyen M, Nandi AK, Bisanzio D, Battle KE, et al. Mapping the global prevalence, incidence, and mortality of *Plasmodium falciparum*, 2000–17: a spatial and temporal modelling study. *The Lancet*. 2019 July 27;394(10195):322–31.
43. Garnham PCC. Malaria Parasites and other Haemosporidia. *Malar Parasites Haemosporidia* [Internet]. 1966 [cited 2023 Oct 29]; Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19672901312>
44. Bray RS, Garnham PC. The life-cycle of primate malaria parasites. *Br Med Bull*. 1982 May;38(2):117–22.

45. Matteelli A, Castelli F. Chapter -2 Life cycle of malaria parasites. 2023 Oct 30;
46. Shortt HE, Garnham PCC. Demonstration of a persisting exo-erythrocytic cycle in *Plasmodium cynomolgi* and its bearing on the production of relapses. *Br Med J*. 1948 June 26;1(4564):1225–8.
47. Fang XD, Kaslow DC, Adams JH, Miller LH. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. *Mol Biochem Parasitol*. 1991 Jan;44(1):125–32.
48. Galinski MR, Medina CC, Ingravallo P, Barnwell JW. A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. *Cell*. 1992 June 26;69(7):1213–26.
49. Kitchen SF. The Infection of Reticulocytes by *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med [Internet]*. 1938 [cited 2023 Oct 29];18(4). Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19392900165>
50. Baird JK. Evidence and implications of mortality associated with acute *Plasmodium vivax* malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Jan;26(1):36–57.
51. Ménard R, Tavares J, Cockburn I, Markus M, Zavala F, Amino R. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nat Rev Microbiol*. 2013 Oct;11(10):701–12.
52. Orish VN, Ansong JY, Onyeabor OS, Sanyaolu AO, Oyibo WA, Iriemenam NC. Overdiagnosis and overtreatment of malaria in children in a secondary healthcare centre in Sekondi-Takoradi, Ghana. *Trop Doct*. 2016 Oct;46(4):191–8.
53. Bisoffi Z, Gobbi F, Buonfrate D, Van den Ende J. Diagnosis of Malaria Infection with or without Disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012;4(1):e2012036.
54. Chandramohan D, Carneiro I, Kavishwar A, Brugha R, Desai V, Greenwood B. A clinical algorithm for the diagnosis of malaria: results of an evaluation in an area of low endemicity. *Trop Med Int Health TM IH*. 2001 July;6(7):505–10.
55. Reyburn H, Mbatia R, Drakeley C, Carneiro I, Mwakasungula E, Mwerinde O, et al. Overdiagnosis of malaria in patients with severe febrile illness in Tanzania: a prospective study. *BMJ*. 2004 Nov 18;329(7476):1212.
56. Lisbôa PGS, Medeiros JMR, de Souza AV, dos Santos BFB, Sanches HOC, da Rocha JLG, et al. Analysis of malaria clinical–epidemiological predictors in individuals from Brazilian Amazon. *Parasitology*. 149(1):10–4.
57. castro espinosa J, Angulo L, Molineros L, Ochoa D. Factores asociados a casos de malaria y plantas medicinales empleadas para su tratamiento en habitantes de Corozal, Colombia. *Bol Malariol Salud Ambient*. 2022 Feb 10;62:8–15.
58. Randrianariveლოსia M, Rasidimanana VT, Rabarison H, Cheplogoi PK, Ratsimbason M, Mulholland DA, et al. Plants traditionally prescribed to treat tazo (malaria) in the eastern region of Madagascar. *Malar J*. 2003 July 24;2:25.
59. Montiel J, Zuluaga LM, Aguirre DC, Segura C, Tobon-Castaño A, Vásquez AM. Microscopic and submicroscopic *Plasmodium* infections in indigenous and non-indigenous communities in Colombia. *Malar J*. 2020 Apr 16;19(1):157.

60. Instituto Nacional de salud, Ministerio de Salud y Protección Social. MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA NO COMPLICADA EN PUESTOS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO. Milenio Editores; 2015.
61. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria [Internet]. 3rd ed. Geneva: World Health Organization; 2015 [cited 2025 Sept 1]. 313 p. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/162441>
62. Azikiwe CCA, Ifezulike CC, Siminialayi IM, Amazu LU, Enye JC, Nwakwunite OE. A comparative laboratory diagnosis of malaria: microscopy versus rapid diagnostic test kits. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012 Apr;2(4):307–10.
63. Shamseddin J, Ghanbarnejad A, Zakeri A, Abedi F, Khojasteh S, Turki H. Molecular Method Is Essential to Identify Asymptomatic Malaria Reservoirs: A Successful Experience in the Malaria Elimination Program in Iran. *Diagnostics*. 2022 Dec;12(12):3025.
64. Tseng YC, Chang YC, Lee C, Hsu SF, Chang PC, Hsu JJ, et al. Molecular diagnosis and therapy for *Plasmodium ovale* infection of a returned traveler from East Africa. *J Formos Med Assoc*. 2022 Jan 1;121(1, Part 2):434–8.
65. Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Rossi S, Montecchini S, Dell'Anna ML, et al. Accurate identification of the six human *Plasmodium* spp. causing imported malaria, including *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium knowlesi*. *Malar J*. 2013 Sept 13;12(1):321.
66. Mens P, Spieker N, Omar S, Heijnen M, Schallig H, Kager PA. Is molecular biology the best alternative for diagnosis of malaria to microscopy? A comparison between microscopy, antigen detection and molecular tests in rural Kenya and urban Tanzania. *Trop Med Int Health*. 2007;12(2):238–44.
67. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990 Aug;346(6287):818–22.
68. Tuerk C, Gold L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science*. 1990 Aug 3;249(4968):505–10.
69. Choi SJ, Ban C. Crystal structure of a DNA aptamer bound to PvLDH elucidates novel single-stranded DNA structural elements for folding and recognition. *Sci Rep*. 2016 Oct 11;6(1):34998.
70. Nakamura Y, Ishiguro A, Miyakawa S. RNA plasticity and selectivity applicable to therapeutics and novel biosensor development. *Genes Cells*. 2012;17(5):344–64.
71. Hermann T, Patel DJ. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science*. 2000 Feb 4;287(5454):820–5.
72. Farrel Côrtes M, Marli Bes T, Ribeiro Deo B, Barbosa Dos Anjos B, Jimenez Galisteo A, Cerdeira Sabino E, et al. Selection and Identification of a DNA Aptamer for Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Using an In-House Cell-SELEX Methodology. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:818737.
73. Shangguan D, Li Y, Tang Z, Cao ZC, Chen HW, Mallikaratchy P, et al. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 8;103(32):11838–43.
74. Zhang K, Sefah K, Tang L, Zhao Z, Zhu G, Ye M, et al. A novel aptamer developed for breast cancer cell internalization. *ChemMedChem*. 2012 Jan 2;7(1):79–84.

75. Savory N, Abe K, Sode K, Ikebukuro K. Selection of DNA aptamer against prostate specific antigen using a genetic algorithm and application to sensing. *Biosens Bioelectron.* 2010 Dec 15;26(4):1386–91.
76. Cheng C, Chen YH, Lennox KA, Behlke MA, Davidson BL. In vivo SELEX for Identification of Brain-penetrating Aptamers. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2013 Jan 8;2(1):e67.
77. Sola M, Menon AP, Moreno B, Meraviglia-Crivelli D, Soldevilla MM, Cartón-García F, et al. Aptamers Against Live Targets: Is In Vivo SELEX Finally Coming to the Edge? *Mol Ther Nucleic Acids.* 2020 Sept 4;21:192–204.
78. Dembowski SK, Bowser MT. CE-SELEX: Rapid Aptamer Selection Using Capillary Electrophoresis.
79. Cossu J, Ravelet C, Martel-Frchet V, Peyrin E, Boturyn D. Peptide-based CE-SELEX enables convenient isolation of aptamers specifically recognizing CD20-expressing cells. *Bioorg Med Chem.* 2024 Aug 1;110:117831.
80. Hu Y, Jiang G, Wen Y, Shao Y, Yang G, Qu F. Selection of aptamers targeting small molecules by capillary electrophoresis: Advances, challenges, and prospects. *Biotechnol Adv.* 2025;78:108491.
81. Ospina-Villa JD, Restrepo-Cano V, Sánchez-Jiménez MM. Bio-SELEX: A Strategy for Biomarkers Isolation Directly from Biological Samples. *Methods Protoc.* 2023 Dec;6(6):109.
82. Lee S, Song KM, Jeon W, Jo H, Shim YB, Ban C. A highly sensitive aptasensor towards Plasmodium lactate dehydrogenase for the diagnosis of malaria. *Biosens Bioelectron.* 2012 May 15;35(1):291–6.
83. Cheung YW, Kwok J, Law AWL, Watt RM, Kotaka M, Tanner JA. Structural basis for discriminatory recognition of Plasmodium lactate dehydrogenase by a DNA aptamer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 1;110(40):15967–72.
84. Frith KA, Fogel R, Goldring JPD, Krause RGE, Khati M, Hoppe H, et al. Towards development of aptamers that specifically bind to lactate dehydrogenase of Plasmodium falciparum through epitopic targeting. *Malar J.* 2018 May 3;17(1):191.
85. Lantero E, Belavilas-Trovas A, Biosca A, Reclons P, Moles E, Sulleiro E, et al. Development of DNA Aptamers Against *Plasmodium falciparum* Blood Stages Using Cell-Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment. *J Biomed Nanotechnol.* 2020 Mar 1;16(3):315–34.
86. Jeon W, Lee S, Manjunatha DH, Ban C. A colorimetric aptasensor for the diagnosis of malaria based on cationic polymers and gold nanoparticles. *Anal Biochem.* 2013 Aug 1;439(1):11–6.
87. Tanner JA, Kong W. Nucleic acid aptamers against plasmodium lactate dehydrogenase and histidine-rich protein II and use thereof for malaria diagnosis. United States; US 9,000,137 B2.
88. Dirkwager RM, Kinghorn AB, Richards JS, Tanner JA. APTEC: aptamer-tethered enzyme capture as a novel rapid diagnostic test for malaria. *Chem Commun.* 2015;51(22):4697–700.
89. Dirkwager RM, Liang S, Tanner JA. Development of Aptamer-Based Point-of-Care Diagnostic Devices for Malaria Using Three-Dimensional Printing Rapid Prototyping. *ACS Sens.* 2016 Apr 22;1(4):420–6.
90. Fraser LA, Kinghorn AB, Dirkwager RM, Liang S, Cheung YW, Lim B, et al. A portable microfluidic Aptamer-Tethered Enzyme Capture (APTEC) biosensor for malaria diagnosis. *Biosens Bioelectron.* 2018 Feb 15;100:591–6.

91. Joseph DF, Nakamoto JA, Ruiz OAG, Peñaranda K, Sanchez-Castro AE, Castillo PS, et al. DNA aptamers for the recognition of HMGB1 from *Plasmodium falciparum* [Internet]. Bioengineering; 2019 Jan [cited 2023 Oct 10]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/528778>
92. Singh NK, Jain P, Das S, Goswami P. Dye Coupled Aptamer-Captured Enzyme Catalyzed Reaction for Detection of Pan Malaria and *P. falciparum* Species in Laboratory Settings and Instrument-Free Paper-Based Platform. *Anal Chem*. 2019 Mar 19;91(6):4213–21.
93. Figueroa-Miranda G, Chen S, Neis M, Zhou L, Zhang Y, Lo Y, et al. Multi-target electrochemical malaria aptasensor on flexible multielectrode arrays for detection in malaria parasite blood samples. *Sens Actuators B Chem*. 2021 Dec 15;349:130812.
94. Lo Y, Cheung YW, Wang L, Lee M, Figueroa-Miranda G, Liang S, et al. An electrochemical aptamer-based biosensor targeting *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein II for malaria diagnosis. *Biosens Bioelectron*. 2021 Nov 15;192:113472.
95. Roca C, Avalos-Padilla Y, Prieto-Simón B, Iglesias V, Ramírez M, Imperial S, et al. Selection of an Aptamer against the Enzyme 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase from *Plasmodium falciparum*. *Pharmaceutics*. 2022 Nov 19;14(11):2515.
96. Ogunmolasuyi AM, Fogel R, Hoppe H, Goldring D, Limson J. A microfluidic paper analytical device using capture aptamers for the detection of PfLDH in blood matrices. *Malar J*. 2022 June 7;21(1):174.
97. Barfod A, Persson T, Lindh J. In vitro selection of RNA aptamers against a conserved region of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Parasitol Res*. 2009 Nov 1;105(6):1557–66.
98. Morales-Velásquez M, Barón-Vera JP, Pulgarín-Osorio MI, Sánchez-Jiménez MM, Ospina-Villa JD. Identification of the ATPase alpha subunit of *Trypanosoma cruzi* as a potential biomarker for the diagnosis of Chagas disease. *Biomark Biochem Indic Expo Response Susceptibility Chem*. 2023 Sept 10;1–9.
99. Farid S, Ghosh S, Dutta M, Stroschio MA. Aptamer-Based Optical and Electrochemical Sensors: A Review. *Chemosensors*. 2023 Dec;11(12):569.
100. Ni S, Zhuo Z, Pan Y, Yu Y, Li F, Liu J, et al. Recent Progress in Aptamer Discoveries and Modifications for Therapeutic Applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2021 Mar 3;13(8):9500–19.
101. Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 July;9(7):537–50.
102. Bradbury A, Plückthun A. Reproducibility: Standardize antibodies used in research. *Nature*. 2015 Feb 5;518:27–9.
103. Yoshikawa AM, Rangel A, Feagin T, Chun EM, Wan L, Li A, et al. Discovery of indole-modified aptamers for highly specific recognition of protein glycoforms. *Nat Commun*. 2021 Dec 7;12(1):7106.
104. Dunn MR, McCloskey CM, Buckley P, Rhea K, Chaput JC. Generating Biologically Stable TNA Aptamers that Function with High Affinity and Thermal Stability. *J Am Chem Soc*. 2020 Apr 29;142(17):7721–4.
105. Agnello L, Camorani S, Fedele M, Cerchia L. Aptamers and antibodies: rivals or allies in cancer targeted therapy? *Explor Target Anti-Tumor Ther*. 2021 Feb 28;2(1):107–21.

106. Dunn MR, McCloskey CM, Buckley P, Rhea K, Chaput JC. Generating Biologically Stable TNA Aptamers that Function with High Affinity and Thermal Stability. *J Am Chem Soc.* 2020 Apr 29;142(17):7721–4.
107. Stanciu LA, Wei Q, Barui AK, Mohammad N. Recent Advances in Aptamer-Based Biosensors for Global Health Applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 2021 July 13;23(Volume 23, 2021):433–59.
108. Nutiu R, Li Y. Structure-Switching Signaling Aptamers: Transducing Molecular Recognition into Fluorescence Signaling. *Chem – Eur J.* 2004;10(8):1868–76.
109. OPS OP de S. PLAN ESTRATÉGICO NACIONAL DE MALARIA 2019- 2022 Subdirección de Enfermedades Transmisibles Equipo Funcional Nacional de Malaria.
110. Ley 1122 de 2008, por la cual se hacen algunas modificaciones en el Sistema General de Seguridad Social en Salud y se dictan otras disposiciones. Colombia. (2008).
111. Decreto 780 de 2016 Por medio del cual se expide el Decreto Único Reglamentario del Sector Salud y Protección Social.
112. Instituto Nacional de salud. RECOMENDACIÓN TÉCNICA SOBRE EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO AL TRATAMIENTO DE MALARIA POR GOTA GRUESA Y PRUEBAS RÁPIDAS Y USO DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS MOLECULARES EN LA DETECCIÓN DE plasmodium s.p.p. EN COLOMBIA. Bogotá D.C;
113. Pacific WHORO for the W. Malaria Light Microscopy : Creating a Culture of Quality : report of WHO SEARO/WPRO Workshop on Quality Assurance for Malaria Microscopy, Kuala Lumpur, Malaysia, 18-21 April 2005. 2005 [cited 2025 May 19]; Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/208347>
114. Simons A. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data [Internet]. Babraham Bioinformatics; 2010. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
115. AptaSuite [Internet]. [cited 2025 May 25]. AptaSUITE. Available from: ptaSUITE: A Full-Featured Bioinformatics Framework for the Comprehensive Analysis of Aptamers from HT-SELEX Experiments. Hoinka, J., Backofen, R. and Przytycka, T. M. (2018). *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 11, 515–517. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.04.006>
116. FASTAptameR 2.0 [Internet]. [cited 2025 May 25]. Available from: <https://fastaptamer2.missouri.edu/>
117. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994 Nov 11;22(22):4673–80.
118. Popena M, Szachniuk M, Antczak M, Purzycka KJ, Lukasiak P, Bartol N, et al. Automated 3D structure composition for large RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2012 Aug 1;40(14):e112.
119. Systèmes D. Discovery Studio Visualizer [Internet]. San Diego; 2021. Available from: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>
120. Angage D, Chmielewski J, Maddumage JC, Hesping E, Caiazzo S, Lai KH, et al. A broadly cross-reactive i-body to AMA1 potentially inhibits blood and liver stages of Plasmodium parasites. *Nat Commun.* 2024 Aug 22;15(1):7206.

121. Thomson-Luque R, Stabler TC, Fürle K, Silva JC, Daubenberger C. Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 as asexual blood stage malaria vaccine candidate. *Expert Rev Vaccines*. 2024 Dec 31;23(1):160–73.
122. Singer M, Kanatani S, Castillo SG, Frischknecht F, Sinnis P. The *Plasmodium* circumsporozoite protein. *Trends Parasitol*. 2024 Dec 1;40(12):1124–34.
123. Casares S, Brumeanu TD, Richie TL. The RTS,S malaria vaccine. *Vaccine*. 2010 July 12;28(31):4880–94.
124. Wong W, Huang R, Menant S, Hong C, Sandow JJ, Birkinshaw RW, et al. Structure of Plasmodium falciparum Rh5-CyRPA-Ripr invasion complex. *Nature*. 2019 Jan;565(7737):118–21.
125. Cerávolo IP, Bruña-Romero O, Braga EM, Fontes CJF, Brito CFA, Souza JM, et al. Anti-Plasmodium vivax duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2005 June;72(6):675–81.
126. Boddey JA, Hodder AN, Günther S, Gilson PR, Patsiouras H, Kapp EA, et al. An aspartyl protease directs malaria effector proteins to the host cell. *Nature*. 2010 Feb;463(7281):627–31.
127. MacMillen Z, Hatzakis K, Simpson A, Shears MJ, Watson F, Erasmus JH, et al. Accelerated prime-and-trap vaccine regimen in mice using repRNA-based CSP malaria vaccine. *Npj Vaccines*. 2024 Jan 10;9(1):12.
128. Gitau G, Shonhai A. Characterization of a the Plasmodium falciparum Hsp70-Hsp90 organising protein. *Malar J*. 2010 Oct 20;9(Suppl 2):P11.
129. Amlabu E, Nyarko PB, Opoku G, Ibrahim-Dey D, Ilani P, Mensah-Brown H, et al. Localization and function of a Plasmodium falciparum protein (PF3D7_1459400) during erythrocyte invasion. *Exp Biol Med*. 2021 Jan;246(1):10–9.
130. Lavstsen T, Turner L, Saguti F, Magistrado P, Rask TS, Jespersen JS, et al. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 domain cassettes 8 and 13 are associated with severe malaria in children. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 June 26;109(26):E1791-1800.
131. Molina-Cruz A, Canepa GE, Barillas-Mury C. Plasmodium P47: a key gene for malaria transmission by mosquito vectors. *Curr Opin Microbiol*. 2017 Dec;40:168–74.
132. Sanchez CP, Dave A, Stein WD, Lanzer M. Transporters as mediators of drug resistance in Plasmodium falciparum. *Int J Parasitol*. 2010 Aug 15;40(10):1109–18.
133. Yoshitake T, Mizuno A, Matsumoto H, Yamamoto M, Fukushima K. [Metabolic effects of isoproterenol in low cardiac output syndrome after open heart surgery]. *Masui*. 1973 Feb 1;22(2):145–52.
134. Cutts JC, Powell R, Agius PA, Beeson JG, Simpson JA, Fowkes FJI. Immunological markers of Plasmodium vivax exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2014 Sept 9;12:150.
135. Requena P, Rui E, Padilla N, Martínez-Espinosa FE, Castellanos ME, Bôtto-Menezes C, et al. Plasmodium vivax VIR Proteins Are Targets of Naturally-Acquired Antibody and T Cell Immune Responses to Malaria in Pregnant Women. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Oct;10(10):e0005009.

136. Knudson-Ospina A, Sánchez-Pedraza R, Pérez-Mazorra MA, Cortés-Cortés LJ, Guerra-Vega AP, Nicholls-Orejuela RS. Perfil clínico y parasitológico de la malaria por *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* no complicada en Córdoba, Colombia. *Rev Fac Med*. 2015 Oct 1;63(4):595–607.
137. Sarmiento H. Comportamiento epidemiológico de la malaria en el Chocó, Pacífico colombiano. 2020;40.
138. Feged-Rivadeneira A, Angel A, González-Casabianca F, Rivera C. Malaria intensity in Colombia by regions and populations. *PLOS ONE*. 2018 Sept 12;13(9):e0203673.
139. Carrera LC, Victoria C, Ramirez JL, Jackman C, Calzada JE, Torres R. Study of the epidemiological behavior of malaria in the Darien Region, Panama. 2015–2017. *PLOS ONE*. 2019 Nov 15;14(11):e0224508.
140. Rock EP, Marsh K, Saul AJ, Wellems TE, Taylor DW, Maloy WL, et al. Comparative analysis of the *Plasmodium falciparum* histidine-rich proteins HRP-I, HRP-II and HRP-III in malaria parasites of diverse origin. *Parasitology*. 1987 Oct;95 (Pt 2):209–27.
141. Joice R, Nilsson SK, Montgomery J, Dankwa S, Egan E, Morahan B, et al. *Plasmodium falciparum* transmission stages accumulate in the human bone marrow. *Sci Transl Med*. 2014 July 9;6(244):244re5.
142. Schneider P, Schoone G, Schallig H, Verhage D, Telgt D, Eling W, et al. Quantification of *Plasmodium falciparum* gametocytes in differential stages of development by quantitative nucleic acid sequence-based amplification. *Mol Biochem Parasitol*. 2004 Sept 1;137(1):35–41.
143. Wampfler R, Mwingira F, Javati S, Robinson L, Betuela I, Siba P, et al. Strategies for Detection of *Plasmodium* species Gametocytes. *PLOS ONE*. 2013 Sept 27;8(9):e76316.
144. Cortés LJ, Guerra AP. Análisis de concordancia de tres pruebas para el diagnóstico de malaria en la población sintomática de los municipios endémicos de Colombia. *Biomédica*. 2020 Mar 1;40(1):117–28.
145. Quintero Moreno DA, Martínez Sánchez LM, Aristizábal Giraldo MA, Valencia Asprilla LE, Muñoz Ríos JH. Malaria, enfermedad tropical de múltiples métodos diagnósticos. *Arch Med Manizales*. 2017 Dec 6;17(2):402–14.
146. Chattopadhyay R, Majam VF, Kumar S. Survival of *Plasmodium falciparum* in human blood during refrigeration. *Transfusion (Paris)*. 2011;51(3):630–5.
147. Bio-Rad L. The Ultimate qPCR Assay Design Guide [Internet]. Bulletin 6894; 2010. Available from: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6894.pdf
148. Kissmann AK, Bolotnikov G, Li R, Müller F, Xing H, Krämer M, et al. IMPATIENT-qPCR: monitoring SELEX success during in vitro aptamer evolution. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2024 Apr 4;108(1):284.
149. Fan H, Wang J, Komiyama M, Liang X. Effects of secondary structures of DNA templates on the quantification of qPCR. *J Biomol Struct Dyn*. 2019 July;37(11):2867–74.
150. Kohlberger M, Gadermaier G. SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection. *Biotechnol Appl Biochem*. 2022 Oct;69(5):1771–92.
151. Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng*. 2007 Oct 1;24(4):381–403.

152. Kaur H, Yung LYL. Probing High Affinity Sequences of DNA Aptamer against VEGF165. *PLOS ONE*. 2012 Feb 16;7(2):e31196.
153. Mohammadinezhad R, Jalali SAH, Farahmand H. Evaluation of different direct and indirect SELEX monitoring methods and implementation of melt-curve analysis for rapid discrimination of variant aptamer sequences. *Anal Methods*. 2020;12(30):3823–35.
154. Guérin M, Vandevenne M, Matagne A, Aucher W, Verdon J, Paoli E, et al. Selection and characterization of DNA aptamers targeting the surface Borrelia protein CspZ with high-throughput cross-over SELEX. *Commun Biol*. 2025 Apr 18;8(1):632.
155. Blind M, Blank M. Aptamer Selection Technology and Recent Advances. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015;4(1):e223.
156. Schütze T, Wilhelm B, Greiner N, Braun H, Peter F, Mörl M, et al. Probing the SELEX Process with Next-Generation Sequencing. *PLOS ONE*. 2011 Dec 29;6(12):e29604.
157. Aschl UJ. Data analysis of HT-SELEX against complex targets [Internet] [Thesis]. Technische Universität Wien; 2021 [cited 2025 June 29]. Available from: <https://repositum.tuwien.at/handle/20.500.12708/19188>
158. Ishida R, Adachi T, Yokota A, Yoshihara H, Aoki K, Nakamura Y, et al. RaptRanker: in silico RNA aptamer selection from HT-SELEX experiment based on local sequence and structure information. *Nucleic Acids Res*. 2020 Aug 20;48(14):e82.
159. Alkhamis O, Byrd C, Canoura J, Bacon A, Hill R, Xiao Y. Exploring the relationship between aptamer binding thermodynamics, affinity, and specificity. *Nucleic Acids Res*. 2025 Apr 11;53(6):gkaf219.
160. Stoltenburg R, Strehlitz B. Refining the Results of a Classical SELEX Experiment by Expanding the Sequence Data Set of an Aptamer Pool Selected for Protein A. *Int J Mol Sci*. 2018 Feb;19(2):642.
161. Yu H, Canoura J, Byrd C, Alkhamis O, Bacon A, Yan A, et al. Improving Aptamer Affinity and Determining Sequence–Activity Relationships via Motif-SELEX. *J Am Chem Soc*. 2025 Mar 19;147(11):9472–86.
162. Bashir A, Yang Q, Wang J, Hoyer S, Chou W, McLean C, et al. Machine learning guided aptamer refinement and discovery. *Nat Commun*. 2021 Apr 22;12(1):2366.
163. Darmostuk M, Rimpelova S, Gbelcova H, Ruml T. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol Adv*. 2015 Nov 1;33(6, Part 2):1141–61.
164. Hasegawa H, Savory N, Abe K, Ikebukuro K. Methods for Improving Aptamer Binding Affinity. *Molecules*. 2016 Mar 28;21(4):421.
165. Tome JM, Ozer A, Pagano JM, Gheba D, Schroth GP, Lis JT. Comprehensive Analysis of RNA-Protein Interactions by High Throughput Sequencing-RNA Affinity Profiling. *Nat Methods*. 2014 June;11(6):683–8.
166. Hellman LM, Fried MG. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Detecting Protein-Nucleic Acid Interactions. *Nat Protoc*. 2007;2(8):1849–61.
167. Godonoga M, Lin TY, Oshima A, Sumitomo K, Tang MSL, Cheung YW, et al. A DNA aptamer recognising a malaria protein biomarker can function as part of a DNA origami assembly. *Sci Rep*. 2016 Feb 19;6:21266.

168. Pitolli M, Cela M, Paulus C, Rudinger-Thirion J, Frugier M. RNA aptamers developed against tRip: A preliminary approach targeting tRNA entry in *Plasmodium*. *Biochimie*. 2024 Feb 1;217:106–15.
169. Cheung YW, Dirkzwager RM, Wong WC, Cardoso J, D'Arc Neves Costa J, Tanner JA. Aptamer-mediated *Plasmodium*-specific diagnosis of malaria. *Biochimie*. 2018 Feb 1;145:131–6.
170. Schwarzer E, Skorokhod O. Post-Translational Modifications of Proteins of Malaria Parasites during the Life Cycle. *Int J Mol Sci*. 2024 Jan;25(11):6145.
171. Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci*. 2009 Feb 10;106(6):1760–5.
172. Seo JW, Lee KJ. Post-translational Modifications and Their Biological Functions: Proteomic Analysis and Systematic Approaches. *BMB Rep*. 2004;37(1):35–44.
173. Kim K, Lee S, Ryu S, Han D. Efficient isolation and elution of cellular proteins using aptamer-mediated protein precipitation assay. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 May 23;448(1):114–9.
174. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003 Mar;422(6928):198–207.
175. Foth BJ, Ralph SA, Tonkin CJ, Struck NS, Fraunholz M, Roos DS, et al. Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. 2003 Jan 31;299(5607):705–8.
176. Seo JW, Lee KJ. Post-translational Modifications and Their Biological Functions: Proteomic Analysis and Systematic Approaches. *BMB Rep*. 2004;37(1):35–44.
177. Wuchty S, Ipsaro JJ. A draft of protein interactions in the malaria parasite *P. falciparum*. *J Proteome Res*. 2007 Apr;6(4):1461–70.

Anexo 1.

Formato de consentimiento informado para participantes adultos

Consentimiento Informado

Investigador principal del proyecto: Juan David Ospina Villa -Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES.

Este documento explica en detalle el propósito del estudio, los posibles riesgos y beneficios que implica, así como los derechos que posee como participante. Le invitamos a tomarse el tiempo necesario para considerar su decisión. La elección de participar o no en este estudio es completamente suya. Le rogamos que no firme a menos que esté completamente satisfecho con las respuestas a todas sus preguntas. Si decide participar, asegúrese de firmar y poner la fecha al final de la última página de este formulario.

¿POR QUE HACEMOS ESTE ESTUDIO? Estamos realizando un estudio de investigación para desarrollar un nuevo método de diagnóstico que permita detectar la presencia del parásito *Plasmodium spp.*, causante de la malaria, a través de una nueva estrategia. Si está interesado en participar en este estudio, le proporcionaremos información detallada sobre cómo se llevará a cabo y qué implicaciones puede tener para usted. Durante el proceso, se tomarán muestras de sangre de su brazo y dedo, utilizando una aguja.

¿QUE PASARÁ DURANTE EL ESTUDIO? Durante el estudio, se tomarán tres muestras de su sangre, para realizar el diagnóstico de malaria y enfermedades adicionales como: *Salmonella*, *Leptospira* y Dengue. Puede estar tranquilo, todas las muestras de sangre se tomarán después de un solo pinchazo en su brazo y su dedo. Además, al participar en el estudio, nos autorizará a recopilar datos clínicos y de laboratorio, así como a realizar análisis especializados utilizando las muestras de sangre que hemos recolectado.

¿CUALES SON LOS RIESGOS EN EL ESTUDIO? La toma de la muestra de sangre puede causar:

- ✓ Pequeña molestia al momento de introducir la aguja.
- ✓ Hematoma en el sitio de la punción que desaparece en pocos días.
- ✓ En raras ocasiones mareo o infección en el lugar de la punción.
- ✓ La cantidad extraída de sangre no causa anemia.

¿CUÁLES SON LOS BENEFICIOS AL PARTICIPAR EN ESTA PRUEBA? Conocer los resultados de las pruebas infecciosas realizadas en la muestra que proporcionará. Estas pruebas tienen como objetivo identificar la causa de algunas enfermedades febriles: *Salmonella*, *Leptospira*, dengue, o Malaria. Este conocimiento le puede proporcionar información importante sobre su salud y bienestar, permitiéndole tomar medidas adecuadas en caso de detectarse alguna infección.

¿QUIÉN PUEDE PARTICIPAR EN EL ESTUDIO? Puede participar cualquier persona que cumpla con los criterios de inclusión descritos a continuación:

Pacientes mayores de 5 años, que presente cuadro febril menor a menor a 15 días, que acudan al servicio de laboratorio del Hospital de Condoto en el departamento del Chocó, que no esté tomando medicamentos para el tratamiento de la Malaria, que no padezca enfermedades graves de base.

La información suministrada a los integrantes del estudio será confidencial. A cada paciente se le asignará un código que permitirá su identificación durante el análisis de los datos. Las muestras tomadas serán almacenadas en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical. La participación en el estudio será voluntaria y no tendrá ningún costo. Usted tampoco recibirá compensación económica. Usted podrá retirarse del estudio en el momento en que lo considere necesario, sin que esto traiga consecuencias.

CONSENTIMIENTO DEL PARTICIPANTE, DEL PADRE/MADRE/TUTOR SI ES MENOR DE EDAD. Se contestaron todas mis preguntas con satisfacción. Me han explicado que la participación en este estudio es voluntaria y que se puede dejar de participar en cualquier momento, si así se desea. Autorizo la toma de la muestra de sangre para ser usada en la investigación y para que los investigadores puedan usar la información recolectada.

Firma del participante: _____

Firma del Padre o Acudiente: _____

Fecha: _____

Firma del investigador: _____

Nombre: _____ Fecha: _____

Firma del testigo: _____

Nombre: _____ Fecha: _____

Anexo 2.

Formato de asentimiento informado para menores de edad

Asentimiento informado para participantes menores de edad

Investigador Principal: Dr. Juan David Ospina Villa.

Mi nombre es: _____ Fecha ____/____/____

Estamos llevando a cabo un estudio de investigación para desarrollar un prototipo de prueba diagnóstica con el fin de detectar la presencia de *Plasmodium spp.*, el parásito causante de la malaria. Nos gustaría saber si estás interesado en participar en este estudio. Si decides participar, te explicaremos detalladamente a ti y a tus padres, cómo se llevará a cabo el estudio y qué implicaciones tiene para ti. Durante el proceso, tomaremos muestras de sangre de tu brazo con una aguja y de tu dedo.

Es importante que sepas que sentirás un pequeño pinchazo en el dedo y en el brazo, durante la toma de muestra de sangre, pero ninguna otra parte del estudio te causará molestias. Por favor hable sobre esto con sus padres antes de decidir si va a participar en el estudio o no.

Además, solicitaremos el permiso de tus padres para que puedas participar en el estudio. Pero aún si sus padres dicen que "sí", Usted puede decidir que no formará parte. Estar en este estudio es tu decisión; Si no desea estar en el estudio, no tiene que hacerlo, nadie se enojará si deseas no participar o aún si cambia de opinión más tarde en el estudio y desea no continuar.

Usted puede preguntar todas las dudas que tenga acerca del estudio. Si después se le ocurre alguna pregunta que no se le ocurra ahora, puede llamarme al teléfono 3053500 ext. 2316.

Al firmar con tu nombre al final, indicarás que aceptas participar en el estudio. Recuerda que, si decides no participar o cambias de opinión más adelante, tus médicos seguirán brindándote atención médica como lo hacen habitualmente. Tú y tus padres recibirán una copia de este formato una vez se ha firmado.

Nombre: _____ Fecha: _____

Firma del investigador: _____

Nombre: _____ Fecha: ____/____/____

Firma del testigo #1: _____

Nombre: _____ Fecha: ____/____/____

Firma del testigo # 2: _____

Anexo 3.

Encuesta estructurada para recolección de datos sociodemográficos y clínicos

Aplicación de la metodología Bio-Selex en el diseño de un prototipo de prueba diagnóstica para la detección de *Plasmodium spp.*

Datos sociodemográficos

No. Caso: _____

1. Nombres y apellidos completos _____
2. Tipo y número de documento de identidad _____
3. Nombre del acudiente (si el paciente es menor de edad)

4. Municipio de residencia _____
5. Zona: 1. __ Urbana 2. __ Rural
6. Barrio/vereda _____
7. Dirección _____
8. Celular _____
9. Edad (años): _____
10. Sexo: 1. __ Hombre 2. __ Mujer

Datos clínicos

11. Fecha de inicio de fiebre (día/mes/año) _____
12. Fecha toma de muestra (día/mes/año) _____
13. Días de fiebre _____
14. Ha presentado infecciones previas en el último semestre: 1. __ No 2. __ Si

¿Cuál(es)? Malaria __ Fiebre tifoidea __ Brucella __ Leptospira __ Rickettsia __ Dengue __ Otras

15. ¿Ha presentado estos síntomas en las últimas semanas?

Señale con una X en la casilla del lado, los síntomas que ha presentado en las últimas semanas.

<input type="checkbox"/>	Fiebre	<input type="checkbox"/>	Cansancio	<input type="checkbox"/>	Petequias (Puntos rojos en piel)
<input type="checkbox"/>	Cefalea (Dolor de cabeza)	<input type="checkbox"/>	Falta de apetito	<input type="checkbox"/>	Equimosis (Morados en piel)
<input type="checkbox"/>	Dolor retrocular	<input type="checkbox"/>	Erupción (brote en piel)	<input type="checkbox"/>	Sangrado por la nariz
<input type="checkbox"/>	Dolor muscular	<input type="checkbox"/>	Dolor abdominal	<input type="checkbox"/>	Vomito con sangre
<input type="checkbox"/>	Dolor en articulaciones	<input type="checkbox"/>	Inflamación de ganglios	<input type="checkbox"/>	Edema (piernas o brazos hinchados)
<input type="checkbox"/>	Escalofríos	<input type="checkbox"/>	Prurito (rasquiña)	<input type="checkbox"/>	¿Otro, cuál?

16. Ha estado en tratamiento antimalárico en los últimos 6 meses: 1. __ No 2. __ Si

Observaciones:

Resultados de laboratorio

Agente/prueba Dx.	Resultado Prueba diagnóstica	
	Positiva	Negativa
Malaria (gota gruesa)		
	Recuento:	
	Formas parasitarias observadas:	
Salmonella (Inmunotropico®)		
Leptospira (Inmunotropico®)		
Dengue (Prueba rápida)		

Elaboró: _____

Anexo 4.

Carta de aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Universidad CES



Sabaneta, 22 de mayo de 2024

Doctor
Juan David Ospina
Instituto Colombiano de Medicina Tropical

Respetado Investigador Ospina:

El Comité de Bioética del Instituto Colombiano de Medicina Tropical en su sesión del día 25 de abril de 2024 como consta en el Acta No. 91, evaluó las consideraciones éticas del proyecto: " **Aplicación de la metodología Bio-Selex en el diseño de un prototipo de prueba diagnóstica para la detección de *Plasmodium spp.***"

El presente proyecto cumple con los lineamientos éticos establecidos por la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud en cuanto a su clasificación como riesgo mínimo, según lo estipulado en el Título II, Capítulo 1, Artículo 11, numeral a de dicha resolución, dado que implica la toma de dos muestras de sangre venosa y una muestra de punción capilar, la cual estará a cargo de un profesional en bacteriología capacitado para la toma de muestras. Estas muestras serán obtenidas en un laboratorio clínico en el departamento del Chocó y posteriormente enviadas al laboratorio del ICMT-CES en Sabaneta-Antioquia.

El Comité de Bioética después de revisar el proyecto decide dar el aval al componente ético de la investigación.

Atentamente,


LUIS ERNESTO LÓPEZ ROJAS
Presidente del Comité de Bioética

Envigado Cll 36D sur km. 4
Sabaneta Cra 43A 52 sur-99
Apartadó Cra 98 103B-46

Tel. 336 02 60 ext. 6126
Tel. 305 35 00 ext. 2280
Tel. 305 35 00 ext. 4207


GOBERNACIÓN DE ANTIOQUIA
Secretaría Seccional de Salud y
Protección Social de Antioquia


UNIVERSIDAD CES
Un compromiso con la excelencia
educacional

Anexo 5.

Registro fotográfico de resultados obtenidos en pruebas rápidas inmunocromatográficas (RDT) Fase I

1. Resultados de la prueba rápida Dengue Duo.



Resultados obtenidos mediante el kit SD BIOLINE Dengue Duo (NS1/IgM/IgG) en pacientes 01 a 35. Se observan las bandas correspondientes a los controles y regiones de prueba, según las instrucciones del fabricante.

2. Resultados de la prueba rápida para Malaria: POSITIVOS



Resultados de la prueba rápida de malaria (Bioline Malaria Ag P.f/P.v) en pacientes positivos (números 32, 35, 38, 44, 45 y 46). Se evidencian bandas correspondientes a antígenos específicos de *P. falciparum* (HRP2) y/o *P. vivax* (pLDH), junto con la línea de control (C).

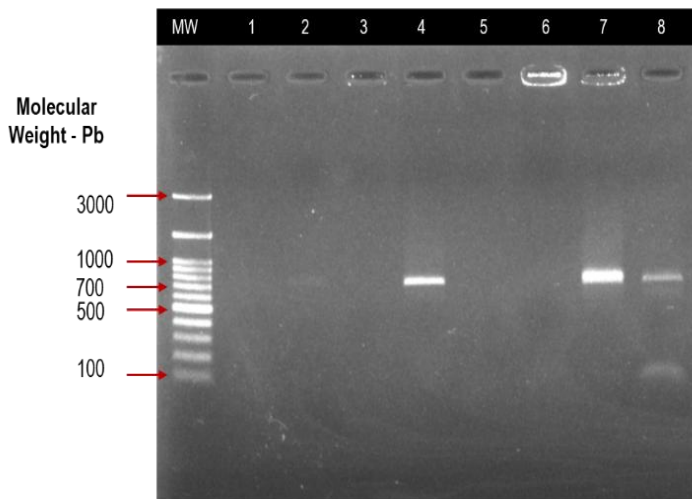
Resultados de la prueba rápida para Malaria: NEGATIVOS



Anexo 6.

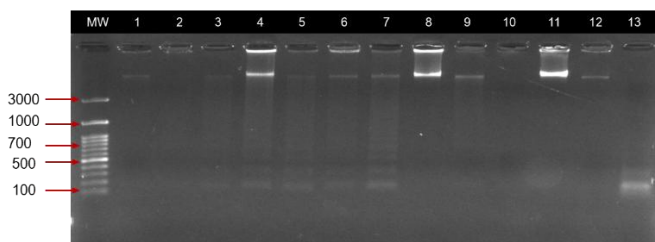
Imágenes de geles de electroforesis tras PCR para detección del gen 18S de *Plasmodium* spp.

MUESTRAS POSITIVAS: Amplímero de 856 Pb.

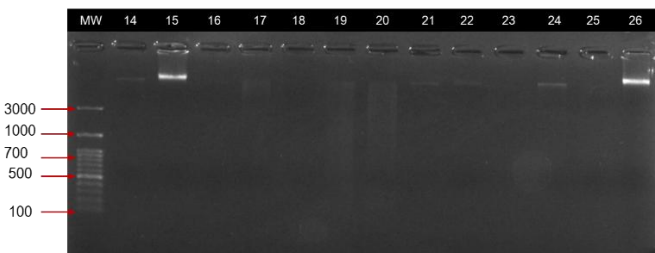


Lane	ID	Species
MW	Molecular Weight	-
1	32	<i>P. falciparum</i>
2	35	<i>P. falciparum</i>
3	37	<i>P. falciparum</i>
4	38	<i>P. vivax</i>
5	40	<i>P. falciparum</i>
6	44	<i>P. vivax</i>
7	45	<i>P. falciparum</i>
8	46	<i>P. vivax</i>

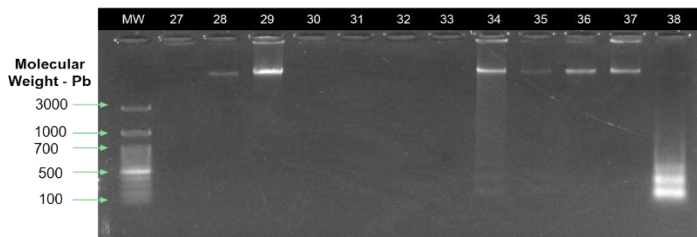
MUESTRAS NEGATIVAS



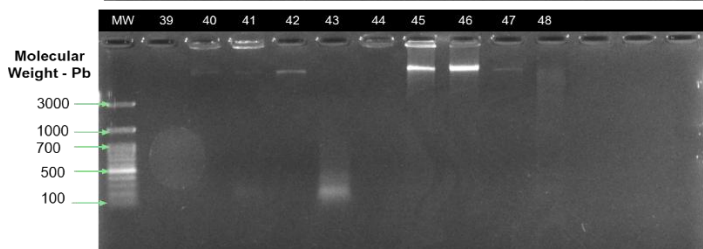
MW	Molecular Weight
1	Sample 001
2	Sample 002
3	Sample 003
4	Sample 004
5	Sample 005
6	Sample 006
7	Sample 007
8	Sample 008
9	Sample 009
10	Sample 010
11	Sample 011
12	Sample 012
13	Sample 013



MW	Molecular Weight
14	Sample 014
15	Sample 015
16	Sample 016
17	Sample 017
18	Sample 018
19	Sample 019
20	Sample 020
21	Sample 021
22	Sample 022
23	Sample 023
24	Sample 024
25	Sample 025
26	Sample 026



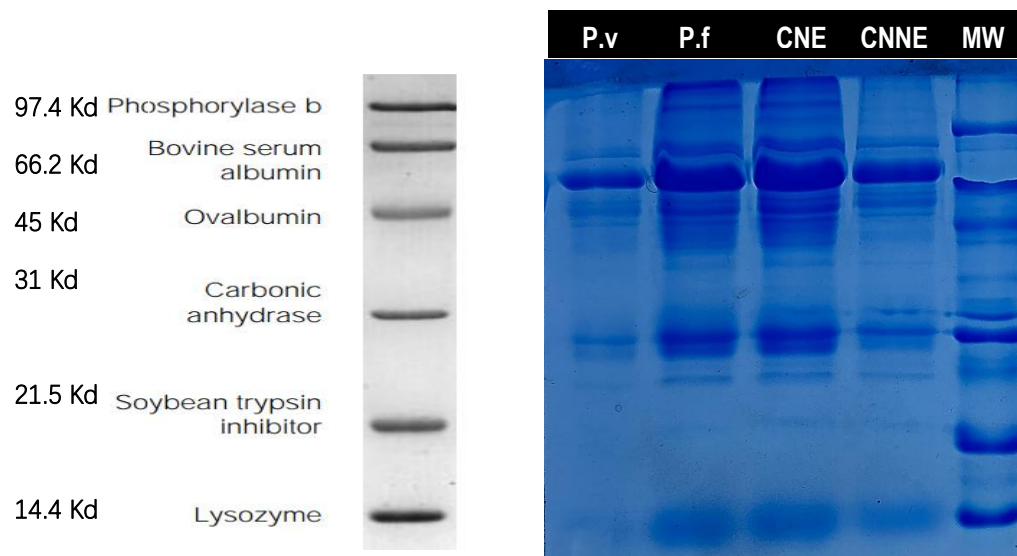
MW	Molecular Weight
27	Sample 027
28	Sample 028
29	Sample 029
30	Sample 030
31	Sample 031
32	Sample 032
33	Sample 033
34	Sample 034
35	Sample 035
36	Sample 036
37	Sample 037
38	Sample 038



MW	Molecular Weight
39	Sample 039
40	Sample 040
41	Sample 041
42	Sample 042
43	Sample 043
44	Sample 044
45	Sample 045
46	Sample 046
47	Sample 047
48	Sample 048

Anexo 7.

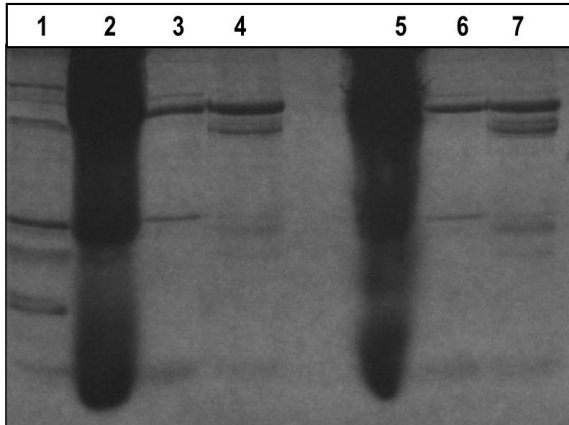
Perfiles proteicos obtenidos mediante SDS-PAGE de extractos totales de pacientes infectados y controles negativos (zonas endémicas y no endémicas).



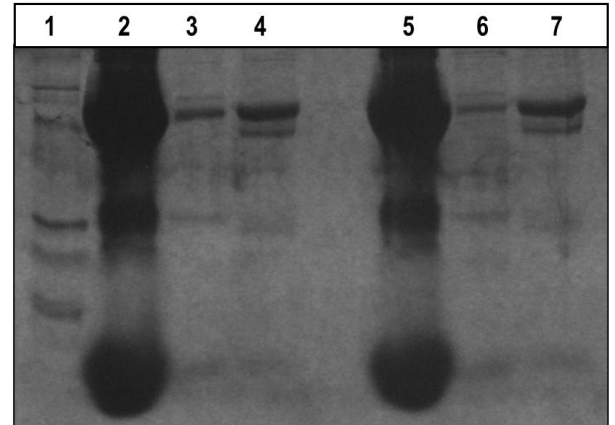
P.v: Extracto de proteínas de pacientes infectados con *P. vivax*, **P.f:** Extracto de proteínas de pacientes infectados con *P. falciparum*, **CNE:** Extracto de proteínas de pacientes Negativos de zona endémica, **CNNE:** Extracto de proteínas de pacientes Negativos de zona No endémica.

Anexo 8.

Comparación electroforética de extractos proteicos antes y después de la depleción de albúmina en controles negativos (zonas endémicas y no endémicas)



Carril 1: Marcador de peso molecular
Carril 2: Sangre total *P. falciparum*
Carril 3: Mx. *P. falciparum* sin Alb – IgG
Carril 4: Albúmina – IgG *P. falciparum*
Carril 5: Sangre total *P. vivax*
Carril 6: Mx. *P. vivax*
Carril 7: Albúmina– IgG *P. vivax*



Carril 1: Marcador de peso molecular
Carril 2: Sangre total CNE
Carril 3: Mx. CNE sin Alb – IgG
Carril 4: Albúmina – IgG CNE
Carril 5: Sangre total CNNE
Carril 6: Mx. CNNE sin Albúmina - IgG
Carril 7: Albúmina– IgG CNNE

Geles de noliacrilamida al 12% tinción de Coomassie 250R 80 Voltios – 2 horas

Anexo 9.

Listado de proteínas de *Plasmodium vivax* seleccionadas por peso molecular y clasificadas por subgrupo

Se adjunta enlace de tabla en Excel con el listado correspondiente a *P. vivax*

[Filtrado de proteínas Pv.xlsx](#)

Anexo 10.

Listado de proteínas de *Plasmodium falciparum* seleccionadas por peso molecular y clasificadas por subgrupo

Se adjunta enlace de tabla en Excel con el listado correspondiente a *P. falciparum*

[Filtrado de proteínas Pf .xlsx](#)