Ars Pharmaceutica
https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars
E-ISSN: 2340-9894 ISSN: 0004-2927

doi: 10.30827/ars.v63i2.22199
Artículos de revisión

Aplicaciones de los nanoanticuerpos en la medicina

Nanoantibodies applications in medicine

Celeste Ortega-Monge[1] 0000-0002-8384-9987
Noelia Arce-Rodríguez[1] 0000-0002-6183-5891
Maripaz Santamaría-Muñoz[1] 0000-0001-7720-4042
Marianela Chavarria-Rojas[1,2] 0000-0002-0507-6982
María Fernanda Rojas Salas[1,2] 0000-0001-6375-1387
Eleaneth Baltodano Viales[1,2]
German L. Madrigal Redondo[1,2] 0000-0002-9856-4044
[1]Universidad de Costa Rica, Facultad de Farmacia, San José, Costa Rica.
[2]Instituto de Investigaciones Farmacéuticas, San José, Costa Rica.

Correspondencia

Marianela Chavarria-Rojas
marianela.chavarria@ucr.ac.cr

Recibido: 08.09.2021
Aceptado: 25.01.2022
Publicado: 21.04.2022

Agradecimientos

Se le agradece al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas por todo el apoyo que dieron para realizar este artículo, así como a su director el Dr. German Madrigal Redondo.

Financiación

Instituto de Investigaciones Farmacéuticas (INIFAR), Universidad de Costa Rica

Conflicto de intereses

Los autores dejan constancia que no existe ningún tipo de conflicto de intereses con la investigación realizada en el presente artículo.

Resumen

Introducción: Los nanoanticuerpos están compuestos únicamente por la región variable de la cadena pesada y se obtienen a partir de algunas especies de camélidos y tiburones. Tienen alta capacidad de unión, alta especificidad, tamaño pequeño, alta accesibilidad y alta penetración de los tejidos, por lo que potencialmente podrían ser utilizados para el tratamiento, diagnóstico y prevención de diferentes enfermedades.

Método: Se realizó una revisión bibliográfica de las aplicaciones médicas de los nanoanticuerpos. Se examinaron artículos científicos publicados en inglés y español desde 2015 a 2021 en las bases de datos Google Académico, ElSevier, PubMed, Clinical trials, Annual Reviews y ScienceDirect. Se prefirieron los estudios que demostraron mayor valor según el idioma, veracidad de la información y fecha de publicación.

Resultados y discusión: En total, se seleccionaron 21 artículos para ser evaluados y analizados, de los cuales 20 fueron estudios preclínicos y un estudio clínico. Los nanoanticuerpos destacan como alternativas terapéuticas, diagnósticas y preventivas contra el cáncer, la hepatitis C, el Alzheimer, el Parkinson, la diarrea provocada por rotavirus y el COVID-19.

Conclusiones: Los nanoanticuerpos pueden ser de gran utilidad para la prevención, diagnóstico y tratamiento de distintas enfermedades; sin embargo, se requiere continuar con el desarrollo de estudios clínicos y preclínicos que respalden la seguridad y eficacia de estos fármacos.

Palabras clave: anticuerpos; nanoanticuerpos; neoplasia; hepatitis; enfermedad de Alzheimer; Parkinson; diarrea; SARS-CoV-2.

Abstract

Introduction: Nanoantibodies are composed solely of the variable region of the heavy chain and are obtained from some species of camelids and sharks. They have high binding capacity, high specificity, small size, high accessibility, and high tissue penetration, so they could potentially be used to treat, diagnose, and prevent several diseases.

Method: A bibliographic review of the medical applications of nanoantibodies was carried out. Scientific articles were examined, published in English and Spanish from 2015 to 2021 in Google Academic, Elsevier, PubMed, Clinical trials, Annual Reviews, and ScienceDirect databases. Studies that showed greater value according to language, information accuracy, and publication date were preferred.

Results and discussion: 21 articles were selected to be evaluated and analyzed, of which 20 were preclinical studies and one clinical study. Nanoantibodies stand out as therapeutic, diagnostic, and preventive alternatives against cancer, hepatitis C, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, diarrhea caused by rotavirus, and COVID-19.

Conclusions: Nanoantibodies can be very useful for the prevention, diagnosis, and treatment of different diseases; however, it is necessary to continue developing clinical and preclinical studies that support the safety and efficacy of these drugs.

Keywords: antibodies; nanoantibodies; neoplasms; hepatitis; Alzheimer disease; Parkinson; diarrhea; SARS-CoV-2.

Puntos clave

Los nanoanticuerpos son de gran relevancia en el área de la medicina, están compuestos únicamente por la región variable de la cadena pesada. Debido a su alta capacidad de unión, especificidad, tamaño pequeño, alta accesibilidad y penetración en los tejidos, se han vuelto una de las principales alternativas para tratar patologías, al igual que los anticuerpos policlonales y monoclonales.

Se han descrito diferentes estudios preclínicos para estudiar la efectividad y aplicabilidad de los nanoanticuerpos en la medicina. En este trabajo se realizó una revisión bibliográfica y los estudios consultados indican que los nanoanticuerpos son una herramienta prometedora para el diagnóstico, prevención y tratamiento de diferentes enfermedades. Sin embargo, es de suma importancia continuar con el desarrollo de estudios clínicos que evidencien la eficacia y seguridad de los nanoanticuerpos.

Introducción

Las células plasmáticas secretan anticuerpos (Abs) en respuesta a un antígeno (Ag). Estos anticuerpos también conocidos como inmunoglobulinas (Ig), son glicoproteínas que forman parte fundamental de la respuesta inmune humoral, debido a que reconocen y reaccionan de manera específica a determinado antígeno[1]. Se encuentran conformadas por dos cadenas ligeras iguales y dos cadenas pesadas simétricas, ambas unidas por puentes disulfuro y uniones no covalentes como las fuerzas electrostáticas y fuerzas de Van Der Waals[2].

Las cadenas ligeras están compuestas por un dominio constante y un dominio variable, mientras que las cadenas pesadas están constituidas por tres dominios constantes y uno variable. El Ab se une con el Ag en las regiones de determinación complementaria (CDR) que se encuentran en la cadena pesada y en la ligera[2,3].

Los Abs policlonales y monoclonales son los que más se han utilizado en la industria farmacéutica; no obstante, no tienen suficiente especificidad y sensibilidad respectivamente, y su estabilidad disminuye con el tiempo[4]. Por esta razón, se han desarrollado nanoanticuerpos (nAbs), compuestos únicamente por la región variable de la cadena pesada[5]. Los nAbs se obtienen a partir de camélidos y tiburones y tienen una alta capacidad de unión y especificidad a pesar de que no cuentan con cadenas ligeras. Además, tienen un tamaño pequeño, alta accesibilidad y penetración en los tejidos[4].

Las especies de tiburones pertenecientes a la familia *Orectolobidae* y las especies *Ginglymostoma cirratum* y *Galeorhinus galeus* son capaces de producir Ig constituidas solamente con la cadena pesada[6], las cuales contienen de tres a cinco dominios constantes. Estos nAbs derivados de tiburón (IgNAR) tienen un tamaño aproximado a 73 kDa y se pueden encontrar en diferentes longitudes dependiendo de si es una Ig transmembranal o de secreción[7]. Las IgNAR tienen una vida media modificable, mayor solubilidad, estabilidad y capacidad de penetración en los tejidos; no obstante, pueden presentar inmunogenicidad, lo que podría afectar sus aplicaciones clínicas[8].

Por otro lado, entre los camélidos utilizados para este propósito se encuentran las especies *Lama glama, Vicugna pacos, Vicugna vicugna y Camelus* sp., pues en su suero se puede encontrar Abs heterodiméricos convencionales compuestos sólo por cadenas pesadas[9]. Estos nAbs derivados de camélidos (VHH) tienen un tamaño de 15 kDa, son las moléculas más pequeñas que se encuentran en la naturaleza capaces de reconocer a un Ag con una alta afinidad y especificidad. Además, tienen la capacidad de acceder a epítopos ocluidos, elevada estabilidad térmica y física, alta penetración en los tejidos tumorales, alta resistencia al proceso de pasteurización y alta versatilidad que facilita su expresión en sistemas como levaduras, bacterias y células de mamíferos[10].

Dentro de las principales ventajas que poseen los nAbs se encuentra su estabilidad incluso en condiciones adversas y con temperaturas extremas durante periodos extensos, además presentan una alta biocompatibilidad, especificidad y diversidad, lo que permite su uso en gran cantidad de tratamientos para diversas enfermedades. Por otra parte, se debe considerar que presentan una inmunogenicidad débil en humanos que podría aumentar con el uso a largo plazo[11].

Los nAbs se han utilizado extensamente en las áreas de investigación, farmacoterapia, biofarmacia, diagnóstico y nanorreactivos,[9] por lo que esta investigación tiene como objetivo ejemplificar algunos de los usos y aplicaciones más comunes de los nAbs en la medicina.

Métodos

La metodología empleada consistió en una revisión bibliográfica de distintas fuentes de información, donde se consultó las bases de datos Google Académico, Elsevier, PubMed, Clinical trials, Annual Reviews y ScienceDirect. Se utilizaron las siguientes palabras clave: anticuerpos; nanoanticuerpos; neoplasia; enfermedad de Alzheimer; camello; hepatitis; parkinson; diarrea; SARS-CoV-2. Los términos se consultaron en inglés y español en un rango temporal del 2015-2021; sin embargo, existen artículos secundarios de años anteriores al 2015 que se utilizaron por ser referencias citadas en los artículos primarios. Los criterios de elegibilidad de las publicaciones incluyen estudios originales que describen estudios preclínicos *in vivo* e *in vitro* y estudios clínicos sobre los usos que tienen los nAbs en la medicina. Se seleccionaron los artículos que demostraron un mayor valor para desarrollar la investigación según el idioma, veracidad de la información, fecha de publicación, entre otros.

Para definir nAbs se utilizaron tres artículos, sobre el uso de nAbs en cáncer se consultaron ocho artículos, en hepatitis cinco artículos, en enfermedad de Parkinson diez artículos, en enfermedad de Alzheimer (EA) cinco artículos, en diarrea causada por rotavirus diez artículos y en COVID-19 ocho artículos. Se utilizaron en total 21 artículos científicos, de los cuales nueve corresponden a estudios preclínicos *in vitro*, 11 a estudios preclínicos *in vivo* y uno es un estudio clínico.

Los estudios publicados se clasificaron según su aplicación, en donde uno es para la detección del cáncer, para para el impedimento de su propagación, y uno para reducir su recurrencia. Se utilizó un estudio para la inhibición de la replicación del virus de la hepatitis C (VHC), dos para el diagnóstico de la EA, dos para la prevención de la EA, dos para el impedimento de la propagación del Parkinson, y uno para el alivio e impedimento de su deterioro. Además, se analizaron tres estudios para prevención y tratamiento de diarrea causada por rotavirus, así como un estudio para el desarrollo de una vacuna contra la diarrea causada por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). Finalmente, se utilizaron tres estudios para la prevención de la COVID-19, uno para la neutralización de este virus y uno para la neutralización del daño celular causado por el mismo.

Resultados y Discusión

Se evaluaron en total 21 artículos científicos, como se observa en la Tabla 1, donde se describen las aplicaciones más destacadas de los nAbs. Por ejemplo, su capacidad de disminuir la propagación del cáncer y del Parkinson, inhibir la replicación del VHC y prevenir la EA. También se utilizan en el diagnóstico de la EA y como estrategia para la prevención de la COVID-19, enfermedad causada por el SARS-CoV-2.

Tabla 1. Estudios preclínicos *in vivo* e *in vitro* y estudios clínicos sobre los usos y aplicaciones de los nAbs en la medicina.

Aplicación	Descripción	Autores y año
Detección del cáncer	Selección de nAbs específicos contra la α-fetoproteína (AFP), lo que permitió la detección ultrasensible de biomarcadores de cáncer.	Chen et al., 2016[12]
Impedimento de propagación del cáncer	Uso de nAbs CAPNb2 contra CapG humano para impedir la formación de lesiones metastáticas o migración celular en el cáncer de mama.	Van et al., 2013[13]

Aplicación	Descripción	Autores y año
Impedimento de propagación del cáncer	Desarrollo de nAbs dirigidos al receptor de quimiocinas (US28) para alterar el crecimiento tumoral en los glioblastomas (GMB).	Heukers et al., 2018[14]
Reducción de la recurrencia del cáncer	Uso de células CAR-T derivadas de nAbs bioespecíficos en linfoma B en período de recaída para evaluar la seguridad y eficacia de las mismas.	Henan Cancer Hospital. 2019[15]
Inhibición de la replicación de la Hepatitis C	Desarrollo de nAbs con clones de *E. coli* para penetrar e inhibir el virus.	Jittavisutthikul et al., 2015[16]
Diagnóstico de la EA	Uso de los VHH como sondas específicas para dianas localizadas en el cerebro, como posible herramienta diagnóstica.	Li et al., 2016[5]
Diagnóstico de la EA	Estudio de los VHH conjugados químicamente en la resonancia magnética de la EA, para el diagnóstico de imágenes moleculares *in vivo*.	Vandesquille et al., 2017[17]
Prevención de la EA	Uso de los VHH para inhibir la actividad β-secretasa e impedir la generación de β-amiloide y por ende su acumulación, lo que permitiría detener el progreso de la EA.	Dorrresteijn et al., 2015[18]
Prevención de la EA	Uso de VHH anti BACE1 por medio de virus adenoasociados (AAV), para disminuir la cantidad de β-amiloide en ratones con la EA. Se evaluó la posibilidad de combinar los VHH con vectores virales para dirigirse a una proteína diana en el sistema nervioso central (SNC).	Rincon et al., 2019[19]
Impedimento de la propagación del parkinson	Uso de los nAbs VH14PEST para contrarrestar los efectos tóxicos de la proteína α-sinucleína (α-Syn), que forma agregados facilitadores de degeneración neuronal.	Butler et al., 2016[20]
Impedimento de la propagación del parkinson	Uso de los nAbs para reducir la toxicidad de la α-Syn mediante la implementación de un mecanismo novedoso, lo cual es significativo en términos terapéuticos.	Marija et al., 2015[21]
Alivio e impedimento del deterioro del parkinson	Orientación selectiva de los nAbs VH14*PEST y NbSyn87*PEST hacia la α-Syn. Se demostró que el primero es capaz de sostener el tono dopaminérgico.	Chatterjee et al., 2018[22]
Prevención de la diarrea por rotavirus	Uso de VHH anti-VP6 en estudios *in vitro* e *in vivo* en ratones. Se demostró la neutralización del virus.	Maffey. 2016[23]

Aplicación	Descripción	Autores y año
Tratamiento y diagnóstico de diarrea por rotavirus	Uso de VHH para el desarrollo del primer biofármaco antiviral para tratar diarrea por rotavirus en neonatos humanos.	Mendez. 2004-2019[24]
Inhibición y tratamiento de la diarrea por rotavirus	Inhibición de la propagación del rotavius mediante el uso de VHH anti-VP6.	Crowell et al., 2021[25]
Desarrollo de vacuna contra la diarrea causada por ETEC	Observación de la efectividad de los VHH para reducir la colonización de ETEC y su uso en la ingeniería inversa para el desarrollo de una vacuna.	Amcheslavsky et al., 2021[26]
Prevención de la COVID-19	Uso de VHH para el bloqueo de la unión de la proteína de espiga del virus con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2, como prevención de la propagación del virus.	Pedreánez et al., 2021[9]
Tratamiento preventivo contra COVID-19	Desarrollo de una biblioteca de VHH e identificación de su potencial como tratamiento preventivo contra la COVID-19.	Esperbent. 2020[27]
Neutralización de diversas variantes de la COVID-19	Uso de un “cocktail” de nAbs para neutralizar diversas variantes de la COVID-19.	Zhou et al., 2021[28]
Prevención y neutralización de la COVID-19	Evidencia la importancia de VHH en la respuesta inmune contra el virus y su inhibición mediante un tratamiento profiláctico.	Hasson et al., 2020[29]
Neutralización de daño celular causado por COVID-19	Demostración de una neutralización cercana al 50% del daño celular causado por la COVID-19, por parte de los nAbs.	Djemli et al., 2021[30]

Todos los ensayos realizados en las publicaciones mencionadas corresponden a ensayos en fase preclínica salvo el descrito en la publicación (15) que corresponde a un trabajo en fase clínica. A continuación, se explican cada uno de estos estudios de manera más detallada.

Cáncer

El cáncer es una patología celular que agrupa diversos orígenes. Su fisiopatología es difícil de describir, ya que involucra distintas entidades clínicas[31]; a pesar de esto, ha sido posible un consenso de principios comunes entre estas[32]. El cáncer inicia cuando las células se dividen de forma anormal y descontrolada, lo que conlleva a la formación de agregados que representan un crecimiento dañino para los tejidos adyacentes y alteran la fisiología normal del organismo[31]. Este proceso puede afectar a los demás tejidos del cuerpo, causando metástasis y la muerte[33]. Actualmente se siguen buscando diferentes potenciales terapéuticos tanto para el diagnóstico como para la terapia del cáncer; un ejemplo de esto es el uso de los nAbs. La eficacia terapéutica de estos está respaldada por diferentes experimentaciones sobre adhesión y migración celular, perturbación de vías de señalización, angiogénesis y proliferación celular. Por ejemplo, existen tumores de difícil acceso que pueden ser visualizados por medio de imágenes moleculares debido a la acumulación homogénea de los nAbs, lo que permite la detección de biomarcadores cancerígenos[34]. Estas son moléculas asociadas a mutaciones genéticas o alteraciones epigenéticas que determinan la predisposición de un individuo a diferentes tipos de cáncer[12].

Una ventaja de los nAbs es su pequeño tamaño que permite una penetración tumoral más homogénea y profunda[34], además de facilitar la unión a antígenos localizados en tejidos difícilmente accesibles[35],

por ejemplo, atravesar la barrera hematoencefálica (BHE)[36]. Una desventaja de los nAbs es su corta vida media *in vivo*[34]. Sin embargo, su tamaño ha sido fundamental para los mecanismos que utilizan estas moléculas en la terapia y diagnóstico del cáncer. Los nAbs son capaces de inhibir la proliferación de células tumorales, puesto que actúan contra las proteínas de superficie de dichas células, lo cual altera su funcionamiento e induce a la apoptosis debido al bloqueo de la señalización a través de un receptor de factor de crecimiento[37].

Aunado a lo anterior, cuando los nAbs están dirigidos a tumores, se pueden unir a los antígenos de manera muy similar a como lo hacen los Abs convencionales, la diferencia radica en que los nAbs son capaces de acceder a epítopos que no son reconocidos por los Abs[38].

En los estudios preclínicos es necesario recalcar las aplicaciones de estas moléculas, un ejemplo es el uso de alpacas inmunizadas contra la α-fetoproteína (AFP), la cual es producida por diversos tumores como carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma. En estudios previos, se seleccionaron nAbs específicos para la AFP y los resultados demostraron que presentan alta solubilidad, reproducibilidad y afinidad. De esta forma, se evidencia que un inmunoensayo mediado por nAbs brinda futuras aplicaciones para detectar biomarcadores de cáncer[12].

Actualmente existen nAbs disponibles para dianas tumorales específicas, por ejemplo, en cáncer de mama se evaluó un nAbs conocido como CAPNb2 en un modelo animal de ratones desnudos. La sobreexpresión del componente del citoesqueleto de actina (CapG) se ha relacionado con la diseminación de las células tumorales en este tipo de cáncer. De esta forma, se estudió la propagación de las células cancerígenas después de administrar los CAPNb2 contra el CapG humano. Este estudio demostró que CAPNb2 interactúa con CapG en el espacio citoplasmático, restringe la migración celular e impide la formación de lesiones metastásicas en los modelos animales estudiados. A partir de estos hallazgos, se ha promovido una iniciativa para el diseño de fármacos utilizando CAPNb2, pues la inhibición del CapG disminuye de forma significativa la metástasis del cáncer de mama[13].

Por otro lado, el glioblastoma (GMB) es el cáncer de cerebro más agresivo que existe, además de ser incurable, se caracteriza por expresar proteínas específicas, así como el receptor de quimiocinas US28, que conducen a vías de señalización inflamatorias y proliferativas. Por esta razón se desarrollaron nAbs dirigidos al receptor US28 capaces de unirse a su dominio extracelular, lo cual altera el crecimiento tumoral *in vitro*. En este estudio se enfatiza el potencial terapéutico de los nAbs para el tratamiento de GMB[14].

Actualmente, en el Hospital de Cáncer Henan se desarrolla un estudio clínico que se encuentra en período de reclutamiento de pacientes. El objetivo es evaluar el funcionamiento de células CAR-T productoras de nAbs biespecíficos para CD19 y CD20, antígenos presentes en el linfoma de células B. Las CAR-T son capaces de disminuir la recurrencia del linfoma en pacientes con recaídas; sin embargo, el estudio aún no ha finalizado[15]. Por tanto, sería deseable que se desarrollaran más estudios clínicos, ya que los nAbs han evidenciado un potencial terapéutico realmente significativo en cáncer.

Hepatitis

Los virus de la Hepatitis B (VHB) y C (VHC) pueden llegar a causar la muerte del paciente tras una infección persistente. El VHB se caracteriza por ser un virus ADN, mientras que el VHC es de tipo ARN y ambos tienen la posibilidad de causar infección tanto en humanos como en chimpancés[39]. La forma de transmisión es por contacto con sangre o fluidos corporales infectados[40]. Esta enfermedad tiene ciertos niveles de afectación crónica en el hígado y con el progreso puede desarrollar fibrosis y carcinoma hepatocelular[41].

La explicación de la fisiopatología de la hepatitis no es sencillo, incluso los receptores de ambos virus no están completamente estudiados, pero se conoce que los hepatocitos son el principal sitio de infección debido a que cuando el virus ingresa al organismo, los polipéptidos de su envoltura interactúan con su membrana celular[39]. Actualmente, más de 170 millones de personas están afectadas por el VHC de manera crónica, por esta razón, es necesario desarrollar terapias novedosas para su tratamiento[42].

Los recientes estudios con nAbs han demostrado su poder inhibitorio sobre la replicación del VHC y su capacidad de reducir el ARN viral en el interior de los hepatocitos. Además, los nAbs penetrables participan en la respuesta inmune innata de la supresión viral y toleran las mutaciones del VHC.

Se realizó un estudio donde el evaluó el uso de los nAbs como posible tratamiento de infecciones por VHC. Los Abs se obtuvieron a partir de *E. coli* como sistema de expresión y su capacidad de penetración en las células hepáticas humanas se demostró mediante un ELISA. El mecanismo de penetración e inhibición es complejo, pero se determinó que con los nAbs es posible desarrollar agentes inmunoterapéuticos sumamente eficientes para pacientes infectados[16]. Este estudio es el único que respalda el uso de los nAbs en esta patología, lo que motiva y justifica la importancia de darle continuidad a esta investigación en otras ramas de la enfermedad u otros mecanismos mediante los cuales los nAbs podrían inhibir la replicación del VHC.

Alzheimer

La EA es el trastorno neurodegenerativo más importante que afecta la corteza cerebral[43] y se caracteriza por una acumulación de depósitos de proteínas tau y amiloides en el cerebro[44]. Los paciente con EA sufren una pérdida progresiva de la función cognitiva que inicia con un déficit de memoria, conforme avanza la enfermedad se presentan alteraciones del lenguaje, pérdida de la independencia y problemas cognitivos mayores y cada vez más limitantes. En la etapa terminal los pacientes pueden presentar delirio, razonamiento alterado, rigidez e incapacidad de realizar por sí mismos sus funciones básicas[43].

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el número de enfermedades neurodegenerativas se va a triplicar en los siguientes 30 años, por lo que ha surgido la necesidad de buscar terapias efectivas para la prevención y tratamiento de estas, como es el uso de nanopartículas[45].

Los VHH tienen un gran futuro para el diagnóstico de imágenes moleculares *in vivo*, debido a que son muy específicos para su antígeno diana, son estables en el tiempo y difunden fácilmente en los tejidos. Además, se pueden humanizar de manera sencilla sin perder sus propiedades. Se ha logrado demostrar que existen VHH con capacidad de atravesar la BHE, por lo que parecen ser una herramienta prometedora para el desarrollo de biomarcadores intracerebrales[17].

En el año 2017 se realizó un estudio sobre el uso de los VHH en análisis de la EA por resonancia magnética. Se utilizó el VHH conocido como R3VQ, capaz de atravesar la BHE y con especificidad por los depósitos de β-amiloide, lesiones características de la EA. Se utilizó *E. coli* para la expresión del R3VQ con una etiqueta 6-histidina en la región carbono terminal, lo cual permite el reconocimiento de los depósitos de β-amiloide mediante técnicas inmunohistoquímicas en el modelo animal utilizado. También, se desarrollaron agentes de contraste para la detección de depósitos de β-amiloide mediante resonancia magnética en los modelos animales[17].

En el 2016 se realizó un estudio sobre el posible uso de nAbs de un solo dominio de camélidos como una herramienta para la obtención de imágenes *in vivo* de dianas cerebrales intracelulares y extracelulares. Para ello, se utilizaron dos nuevos VHH capaces de reconocer específicamente los depósitos de los ovillos neurofibrilares de proteínas tau intracelulares y amiloides extracelulares. Se utilizaron ratones con lesiones por depósitos de proteína β-amiloide y se les administró VHH en la corteza frontal; posteriormente, se recolectaron muestras de tejido cerebral para el posterior análisis histológico[5]. Otros animales recibieron VHH conjugado con Alexa Fluor® y se realizaron los análisis correspondientes mediante microscopía confocal láser de barrido.

Los hallazgos obtenidos demuestran que VHH-E9 con un punto isoeléctrico básico atraviesa de manera pasiva la BHE, ingresa en el parénquima cerebral y se une a los astrocitos. En el estudio se concluyó que los VHH pueden ser utilizados como sondas específicas para dianas cerebrales localizadas a nivel intracelular y extracelular, lo que respalda su uso como una nueva herramienta de diagnóstico en neurología[5].

En el 2015 se estudió la inhibición de la actividad de la enzima β-secretasa (BACE1) mediada por los VHH. Se observó una menor producción y acumulación de la proteína β-amiloide, relacionado con la

disminución del progreso de la EA. En un ensayo con células de neuroblastoma se evidenció el efecto inhibitorio de los VHH-B3 sobre la BACE1 y en un ensayo *in vivo*, el VHH-B3 disminuyó los niveles de β-amiloide en cerebro y plasma. Por esta razón, los VHH son considerados una estrategia terapéutica prometedora para disminuir la progresión de la EA, además, podrían ser utilizados para ayudar a comprender mejor el papel de la BACE1 en la EA[18].

La administración de VHH anti-BACE1 mediante virus adenoasociados (AAV) demostró disminuir la cantidad de β-amiloide en un estudio preclínico realizado en ratones con la EA. Los VHH suelen tener una difusión limitada a través de la BHE porque se eliminan rápidamente del parénquima, por lo que se utilizó AAV como vector para dirigir la entrega al sistema nervioso central (SNC). En un modelo animal de ratón con amiloidosis cerebral se observó una disminución importante en los niveles de β-amiloide después de la administración de una dosis única de VHH-B9 en el SNC. Con esto, se demostró la posibilidad de de combinar los VHH con vectores virales para dirigirse a una proteína diana localizada en el SNC[19].

Parkinson

Se considera la enfermedad de Parkinson como la segunda causa de neurodegeneración crónica progresiva, que se relaciona con un declive o empeoramiento de las neuronas dopaminérgicas encontradas en las sustancia nigra pars compacta. Como consecuencia, los pacientes sufren de síntomas como temblores en reposo, postura inestable, afectación gastrointestinal, afectación del sueño, y alteraciones cognitivas y bradicinesia, que se presentan ante un grado importante de degeneración neuronal. Por lo general, el inicio y detección de la enfermedad se da alrededor de los 60 años, pero puede afectar a pacientes más jóvenes.[46, 47,48, 49]

El declive neuronal puede estar asociado a una disfunción mitocondrial o a la agregación de la proteína α-sinucleína (α-Syn)[50], la cual tiene un papel importante en la liberación de neurotransmisores[51]. Debido a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, se reduce la liberación de dopamina en el cuerpo estriado. Por esta razón los circuitos neuronales en los ganglios basales se ven afectados, lo que resulta en disminución de la función dopaminérgica y pérdida del control del movimiento[48].

En un estudio sobre la enfermedad de Parkinson, se evidenció que el nAbs bifuncional llamado VH14PEST es capaz de contrarrestar los efectos tóxicos de la α-Syn y posee efectos proteostáticos heterólogos[20]. La α-Syn posee un componente no amiloide (NAC), que tiene una región de interacción hidrofóbica esencial para la agregación de esta proteína neuronal[52]. En otro estudio se demostró la capacidad de los nAbs para reducir la toxicidad de la α-Syn al inhibir la formación de fibrillas, lo que provoca, mediante la unión del nAbs, una conversión conformacional de oligómeros de la α-Syn de alta estabilidad a una conformación menos estable. Ambos estudios sugieren el mismo resultado pero con mecanismos diferentes que podrían ser relevantes en términos terapéuticos[21].

En otra investigación se realizó un modelo animal basado en la sobreexpresión de la α-Syn donde se administraron dos nAbs orientados selectivamente a la proteína con el fin de comparar su potencial terapéutico. Los nAbs utilizados son el VH14-PEST donde PEST es la región del NAC y NbSyn87-PEST donde PEST es la región C terminal de la proteína. Se mostró que los dos nAbs poseen actividad contra la α-Syn y que el VH14-PEST es capaz de sostener el tono dopaminérgico[22].

Todo lo precedente hace referencia a estudios preclínicos indispensables para investigar el posible potencial terapéutico de las diferentes tecnologías, en este caso los nAbs. Sin embargo, no se encontraron reportes de estudios clínicos vigentes ni en periodo de reclutamiento que permitan evidenciar el potencial terapéutico en humanos o que promuevan el desarrollo de algún fármaco para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson a base de nAbs.

Diarrea

La diarrea se define como el aumento en la frecuencia de las deposiciones que puede llegar a ser de tres o más al día, además de cambios en la consistencia de las heces, que por lo general pasan a ser blandas o líquidas. Puede clasificarse según su duración como aguda, cuando se da por menos de 14 días, y persistente o crónica si sucede por encima de dos semanas[53]. Se señala el exceso de contenido

líquido en las heces como el mecanismo más frecuente de diarrea crónica[54]. Asimismo, se atribuyen a las diarrea aguda distintas causas, entre las que se encuentran: infecciones por microorganismos o por intoxicación alimentaria, asociada a fármacos o sustancias tóxicas, intolerancia a alimentos, entre otros; además, cualquier causa de diarrea crónica puede manifestarse de manera aguda en las primeras semanas[55]. Las diarreas se pueden agrupar con distintos nombres de acuerdo a sus características, por lo que estas son de sumo cuidado y deben de ser vigiladas[56]. Un ejemplo de esto, es la diarrea causada por rotavirus, la cual puede ocasionar la muerte en menores de 5 años[57].

Actualmente, existen dos vacunas en el mercado contra el rotavirus; sin embargo, estas no han mostrado los resultados esperados en las poblaciones más expuestas al virus, por lo que ha sido necesario el estudio de la enfermedad con el fin de desarrollar un tratamiento efectivo para la misma[58]. Se ha estudiado el uso de nAbs en diarreas provocadas por rotavirus, ya que estos poseen un sitio de reconocimiento de antígeno de una sola cadena. Esta es la principal razón por la que algunos animales como las vacas no se ven afectados por el virus, a pesar de la ingesta de agua contaminada[59].

A partir de este descubrimiento, se realizó una investigación en la cual se inmunizó una llama adulta con proteína VP6 derivada de una cepa de rotavirus bovino. Se extrajo ADN de las células mononucleares y se amplificaron los fragmentos que codifican para VHH. Se seleccionaron dos clones de nAbs con amplia actividad neutralizante tanto *in vitro*, frente a cepas de rotavirus animal y humano, como *in vivo* en ratones y se observó una reducción en la duración y severidad de la diarrea causada por el virus. Se concluyó que la administración de VHH anti-VP6 es una buena opción como tratamiento profiláctico, así como una opción terapéutica después de la aparición de los primeros síntomas[23].

Adicionalmente, un estudio realizado en ratones y cerdos gnotobióticos evidenció la importancia de los VHH en el diagnóstico de rotavirus y su capacidad de neutralizar específicamente las cepas tipo A, lo que establece un antecedente para el desarrollo de un tratamiento terapéutico. Por esta razón, con el uso de VHH se patentó el kit diagnóstico Rotadial®. Asimismo, en el 2019 se patentó un biofármaco antiviral para el tratamiento de infecciones virales por rotavirus en neonatos humanos basado en un tratamiento previo utilizado en terneros, el cual mostró excelentes resultados en la neutralización del rotavirus tipo A por VHH[24].

En otro estudio se realizó un modelo animal donde se administró dos VHH. A través de un ELISA, una titulación de infectividad viral y un cultivo celular de inmunofluorescencia, se mostró la unión de los VHH a la proteína VP6, la protección parcial contra la diarrea severa y la reducción en la propagación del virus. Por esto, se consideran una buena opción para tratar el virus, y como consecuencia, la diarrea causada por este[25].

Actualmente no existe vacuna para la diarrea causada por ETEC. Sin embargo, se ha visto que el uso de VHH para tratar enfermedades infecciosas en mucosas ha sido muy efectivo. Los VHH reconocen epítopos conservados en patógenos hipervariables, por lo que el uso de una combinación de estos puede llegar a ser efectivo e incluso más accesible económicamente que los anticuerpos monoclonales. Adicionalmente, pueden ser utilizados para ayudar a la ingeniería inversa de una vacuna eficaz contra esta bacteria[26].

COVID-19

La COVID-19 es una enfermedad causada por el Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2)[60]. Debido a su alta transmisibilidad, se declaró pandemia a inicios del 2020, lo que desencadenó una cantidad importante de estudios e investigaciones[61]. La infección puede ser asintomática o pueden presentarse cuadros clínicos leves o moderados e inclusive graves como el síndrome de distrés respiratorio agudo y shock séptico. La variedad de síntomas junto con la facilidad de mutación, han sido un gran reto para desarrollar una vacuna efectiva y un tratamiento que permita reducir los cuadros graves del virus[62].

El SARS-CoV-2, por medio de una interacción entre la glicoproteína de la espícula y el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2), ingresa a la célula huésped. Por esta razón, con la intención de generar una prevención directa, se aisló y caracterizó un fragmento de VHH de alta especificidad a un dominio globular presente en la superficie distal de la espícula del virus, evitando de

esta forma su unión directa con la ECA2. Adicionalmente, este VHH puede expresarse en grandes cantidades en bacterias, por lo que representa una buena opción para su desarrollo a gran escala para la intervención de la COVID-19[9].

Debido al futuro prometedor de los nAbs para combatir la COVID-19, diferentes laboratorios han desarrollado la primera biblioteca de VHH contra COVID-19, lo que permite la selección de Abs con el fin de neutralizar la infección viral, así como obtener Abs monoclonales que permitan la identificación del virus. Además, de funcionar como fármacos preventivos o terapéuticos complementarios a la vacunación[27].

Se han desarrollado medicamentos con nAbs que están en fase preclínica o clínica. En octubre del 2020, 13 fármacos se encontraban en fase I/II de estudios clínicos, dos medicamentos estaban en fase II/III y otros dos en fase III. Estas investigaciones representan un futuro prometedor para la utilización de Abs contra esta enfermedad. Por ejemplo, en 2020, se realizó un estudio en un modelo animal donde se evaluaron dos nAbs con alta afinidad a la proteína S del SARS-CoV-2. Se concluyó que al administrar una mezcla de los nAbs, es posible atacar diferentes sitios de unión de la proteína y lograr la neutralización de diversas variantes del virus. Cabe destacar que este estudio inició su primera fase clínica en junio del mismo año, esperando tener resultados alentadores para combatir el virus[28].

Además, otro estudio muestra cómo el administrar una forma inactiva del virus a camellos, desencadena una respuesta inmune favorable contra los componentes del virus, de manera que se produce una IgG especializada que es obtenida a partir del suero y de la leche de estos animales. Por esta razón, se cree que la utilización de estos nAbs puede producir una respuesta selectiva capaz de inhibir y neutralizar al virus, también se espera que el consumir la leche de estos animales se genere una respuesta inmunitaria pasiva como profilaxis para prevenir un cuadro grave. Además, se indica que los pacientes infectados pueden ingerir la leche tres veces al día para neutralizar el virus[29].

A través del desarrollo de VHH se ha demostrado su potencial como tratamiento empírico para la COVID-19. Para ello, se seleccionaron tres VHH que mostraban, en estudios *in vitro*, una neutralización viral cercana al 50%. De esta manera, se concluyó que pueden ser utilizados en profilaxis y como tratamiento empírico, reduciendo las complicaciones, y así, elevando la tasa de supervivencia contra la COVID-19[30].

Conclusiones

Debido a la alta especificidad, tamaño pequeño y otras características favorables de los nAbs, se ha evaluado su uso en enfermedades como cáncer, hepatitis, Alzheimer, Parkinson, diarrea y COVID-19. Los estudios consultados indican que los nAbs son una herramienta prometedora para el diagnóstico, prevención y tratamiento de diferentes enfermedades. Sin embargo, es de suma importancia continuar con el desarrollo de estudios clínicos que evidencien la eficacia y seguridad de los nAbs.

Bibliografía

1. Hameed A. Conventional and Nano- Antibodies and Their Future Uses. AAJMS. 2019;2(3):14-34.

2. Langjahr P, Sotelo P. Presente y futuro de los anticuerpos recombinantes terapéuticos. Mem Inst Investig Cienc Salud. 2016;14(2):110-21.

3. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Antigen Recognition in the Adaptive Immune System: Structure of Lymphocyte Antigen Receptors and Development of Immune Repertoires. En: Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System [Internet]. 6ª ed. 2020. Disponible en: https://www-clinicalkey-com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/#!/content/book/3-s2.0-B9780323549431000040?scrollTo=%23hl0000384

4. Wong A, Sykora C, Rogers L, Higginbotham J, Wang J. Modified Nanoantibodies Increase Sensitivity in Avidin-Biotin Immunohistochemistry. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2018;26(9):682-8.

5. Li T, Vandesquille M, Koukouli F, Dudeffant C, Youssef I, Lenormand P, et al. Camelid single-domain antibodies: A versatile tool for *in vivo* imaging of extracellular and intracellular brain targets. J Controlled Release. 2016;243:1-10.

6. Liu W, Song H, Chen Q, Yu J, Xian M, Nian R, et al. Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies. Mol Immunol. 2018;96:37-47.

7. Vázquez V. Análisis transcriptómico y desarrollo de una biblioteca de los genes codificantes para anticuerpos IgNAR del tiburón *Heterodontus francisci*. Baja California, México: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada; 2018.

8. English H, Hong J, Ho M. Ancient species offers contemporary therapeutics: an update on shark VNAR single domain antibody sequences, phage libraries and potential clinical applications. 2020. Doi:10.1093/abt/tbaa001

9. Pedreáñez A, Mosquera J, Muñoz N, Tene D. Nanoanticuerpos: pequeñas moléculas, grandes posibilidades. Acta Bioclinica. 2021;11(22):296-319. Doi:0.6084/m9.figshare.14200553.

10. Parreno G, Vega C, Bok M, Adúriz M, Aguilar A. Nanoanticuerpos derivados de llamas: una alternativa innovadora para controlar las diarreas por rotavirus y norovirus humano. ANMAT. 2019;26-30.

11. Li C, Tang Z, Hu Z, Wang Y, Yang X, Mo F, et al. Natural Single-Domain Antibody-Nanobody: A Novel Concept in the Antibody Field. J Biomed Nanotechnol.2018;14(1):1-19.

12. Chen J, He Q, Xu Y, Fu J, Li Y, Tu Z, et al. Nanobody medicated immunoassay for ultrasensitive detection of cancer biomarker alpha-fetoprotein. Talanta. 2016;147:523-30. Doi: 10.1016/j.talanta.2015.10.027.

13. Van Impe K, Bethuyne J, Cool S, Impens F, Ruano-Gallego D, De Wever O, et al. A nanobody targeting the F-actin capping protein CapG restrains breast cancer metastasis. Breast Cancer Res BCR. 2013;15(6):R116. Doi: 10.1186/bcr3585.

14. Heukers R, Fan TS, Wit RH de, Senten JR van, Groof TWM de, Bebelman MP, et al. The constitutive activity of the virally encoded chemokine receptor US28 accelerates glioblastoma growth. Oncogene. 2018(30):1-12. Doi: 10.1038/s41388-018-0255-7.

15. Henan Cancer Hospital. Clinical Study of CD19/CD20 Bispecific Nanobody-derived CAR-T Cells in Refractroy/Relasped B Cell Lymphoma [Internet]. clinicaltrials.gov. 2019. Report No.: NCT03881761.

16. Jittavisutthikul S, Thanongsaksrikul J, Thueng-In K, Chulanetra M, Srimanote P, Seesuay W, et al. Humanized-VHH transbodies that inhibit HCV protease and replication. Viruses. 2015;7(4):2030-56.Doi: 10.3390/v7042030.

17. Vandesquille M, Li T, Po C, Ganneau C, Lenormand P, Dudeffant C, et al. Chemically-defined camelid antibody bioconjugate for the magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease. mAbs. 2017;9(6):1016-27.

18. Dorresteijn B, Rotman M, Faber D, Schravesande R, Suidgeest E, Weerd L van der, et al. Camelid heavy chain only antibody fragment domain against β-site of amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 inhibits β-secretase activity *in vitro* and *in vivo*. FEBS J. 2015;282(18):3618-31.

19. Rincon M, Zhou L, Marneffe C, Voytyuk I, Wouters Y, Dewilde M, et al. AAV mediated delivery of a novel anti-BACE1 VHH reduces Abeta in an Alzheimer's disease mouse model. bioRxiv. 2019;1-22.

20. Butler DC, Joshi SN, Genst ED, Baghel AS, Dobson CM, Messer A. Bifunctional Anti-Non-Amyloid Component α-Synuclein Nanobodies Are Protective In Situ. PLOS ONE. 2016;11(11):e0165964. Doi: 10.1371/journal.pone.0165964.

21. Iljina M, Hong L, Horrocks MH, Ludtmann MH, Choi ML, Hughes CD, et al. Nanobodies raised against monomeric α-synuclein inhibit fibril formation and destabilize toxic oligomeric species. BMC Biol. 2017;15:57. Doi: 10.1186/s12915-017-0390-6.

22. Chatterjee D, Bhatt M, Butler D, De Genst E, Dobson CM, Messer A, et al. Proteasome-targeted nanobodies alleviate pathology and functional decline in an α-synuclein-based Parkinson's disease model. Npj Park Di. 2018;4(1):1-10. Doi: 10.1038/s41531-018-0062-4.

23. Maffey L. Prevención y tratamiento de Rotavirus A mediante nanoanticuerpos VHH anti-VP6 [Tesis doctoral]. Buenos Aires: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; 2016.

24. Mendez, M. Vinculación, transferencia y utilidad social de los conocimientos : el caso de INCUINTA (2004-2019) [Tesis de grado]. Universidad Nacional de La Plata: Memoria Académica; 2021.

25. Crowell L, Goodwine C, Holt C, Rocha L, Vega C, Rodriguez S, et al. Development of a platform process for the production and purification of single-domain antibodies. Biotechnol Bioeng. 2021;118(9):3348-3358. Doi: 10.1002/bit.27724.

26. Amcheslavsky A, Wallace A, Ejemel M, Li Q, McMahon C, Stoppato M, et al. Anti-CfaE nanobodies provide broad cross-protection against major pathogenic enterotoxigenic *Escherichia coli* strains, with implications for vaccine design. Sci Rep. 2021;11(1):2751. Doi: 10.1038/s41598-021-81895-0.

27. Esperbent, C. Construyen una biblioteca de nanoanticuerpos de llamas contra la COVID-19. Revista de Investigaciones Agropecuarias. 2020;46(2):145-7.

28. Zhou Z, Wang X, Zhang X, Zhang Y, *et al*. Significance of neutralizing antibodies in COVID-19 therapy: progress and prospect. J Chin Pharm Sci. 2021;30(2):87-106. Doi: 10.5246/jcps.2021.02.008.

29. Hasson S, Al-Jabri A. Immunized camels and COVID-19. Asian Pac J Trop Med. 2020;13(6):239-241. Doi: 10.4103/1995-7645.282561.

30. Djemli S, Tahraoui A, Boussena M, Rouag F, *et al*. Camelid Antibodies May well be effective Against SARS-CoV-2 variants. 2021;6(6):604-606.

31. Sánchez C. Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. Rev Médica Clínica Las Condes. 2013;24(4):553-62. Doi: 10.1016/S0716-8640(13)70659-X.

32. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57-70. Doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.

33. Mitrus I, Bryndza E, Sochanik A, Szala S. Evolving models of tumor origin and progression. Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med. 2012;33(4):911-7. Doi: 10.1007/s13277-012-0389-0.

34. Van Audenhove I, Gettemans J. Nanobodies as Versatile Tools to Understand, Diagnose, Visualize and Treat Cancer. EBioMedicine. 2016;8:40-8. Doi: 10.1016/j.ebiom.2016.04.028.

35. Nikooharf A, Arezumand R, Mansouri K, Khoshi AH, Namdar Ahmadabad H. Development of a Recombinant Monospecific Anti-PLGF Bivalent Nanobody and Evaluation of it in Angiogenesis Modulation. Mol Biotechnol. 2020;62(11-12):580-8. Doi: 10.1007/s12033-020-00275-7.

36. Jiménez A. Virtual biopsy: seeing invisible cancer. SEBBM. 2018. Doi: 10.18567/sebbmdiv_ANC.2018.01.1.

37. Arezumand R, Alibakhshi A, Ranjbari J, Ramazani A, Muyldermans S. Nanobodies As Novel Agents for Targeting Angiogenesis in Solid Cancers. Front Immunol. 2017;0. Doi: 10.3389/fimmu.2017.01746.

38. Verhaar ER, Woodham AW, Ploegh HL. Nanobodies in cancer. Semin Immunol. 2020;101425. Doi: 10.1016/j.smim.2020.101425.

39. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. Annu Rev Pathol Mech Dis. 2006;1(1):23-61. Doi: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100230.

40. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. N Engl J Med. 2004;350(11):1118-29. Doi: 10.1056/NEJMra031087.

41. Ferrari C, Missale G, Boni C, Urbani S. Immunopathogenesis of hepatitis B. J Hepatol. 2003;39 Suppl 1:S36-42. Doi: 10.1016/s0168-8278(03)00137-5.

42. Pawlotsky J-M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. Trends Microbiol. 2004;12(2):96-102. Doi: 10.1016/j.tim.2003.12.005.

43. Rius S, Tormos AM, Pérez S, Taléns R. Vascular pathology: Cause or effect in Alzheimer disease?. Neurol Engl Ed. 2018;33(2):112-20. Doi: 10.1016/j.nrl.2015.07.010.

44. Apostolova L. Alzheimer Disease. Contin Lifelong Learn Neurol. 2016;22(2):419-34. Doi: 10.1212/CON.0000000000000307.

45. Asefy Z, Hoseinnejhad S, Ceferov Z. Nanoparticles approaches in neurodegenerative diseases diagnosis and treatment. Neurol Sci. 2021;42(7):2653-60. Doi: 10.1007/s10072-021-05234-x.

46. Marín M DS, Carmona V H, Ibarra Q M, Gámez C M, Marín M DS, Carmona V H, et al. Enfermedad de Parkinson: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. Rev Univ Ind Santander Salud. 2018;50(1):79-92. Doi: 10.18273/revsal.v50n1-2018008.

47. Vázquez GE, Zoghbi HY. Parkinson's Disease Genetics and Pathophysiology. Annu Rev Neurosci. 2021;44(1):87-108. Doi: 10.1146/annurev-neuro-100720-034518.

48. DeMaagd G, Philip A. Parkinson's Disease and Its Management. Pharm Ther. 2015;40(8):504-32.

49. de Lau LML, Breteler MMB. Epidemiology of Parkinson's disease. Lancet Neurol. 2006;5(6):525-35. Doi: 10.1016/S1474-4422(06)70471-9.

50. Michel PP, Hirsch EC, Hunot S. Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. Neuron. 2016;90(4):675-91.Doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.038.

51. α-Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly *in Vivo* and *in Vitro* | Science. 2010. doi: 10.1126/science.1195227.

52. Giasson BI, Murray IVJ, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of α-Synuclein Is Essential for Filament Assembly *. J Biol Chem. 2001;276(4):2380-6. Doi: 10.1074/jbc.M008919200.

53. Múñez E, Pintos I, Ramos A. Protocolo diagnóstico y tratamiento de la diarrea en el paciente inmunocomprometido. Med - Programa Form Médica Contin Acreditado. 2018;12(55):3285-3288. Doi: 10.1016/j.med.2018.04.017.

54. Barraca J. Protocolo diagnóstico de la diarrea crónica. Med - Programa Form Médica Contin Acreditado.2016;12(4):197-202. Doi: 10.1016/j.med.2016.02.013.

55. Arco R, Lázaro J, Díaz P. Protocolo diagnóstico y terapéutico de la diarrea aguda. Med - Programa Form Médica Contin Acreditado. 2019;12(87):5135-9. Doi: 10.1016/j.med.2019.10.007.

56. Escribano L, Rodríguez A, Centeno G. Protocolo diagnóstico etiopatogénico de la diarrea crónica. Med - Programa Form Médica Contin Acreditado. 2020;13(1):38-44. Doi: 10.1016/j.med.2020.01.005.

57. Fei P, Chen J, Jiang Y, Bai H, *et al*. Rotavirus-Induced Diarrhea Changes the Proteins, Amino Acids and Fatty Acids Profiles in Fecal Samples of the Infants. Iran J Pediatr. 2021;31(1). Doi: 10.5812/ijp.100031.

58. Maffey L, Vega CG, Parreño V, Garaicoechea L. Controlling Rotavirus-associated diarrhea: Could single-domain antibody fragments make the difference? Rev Argent Microbiol. 2015;47(4):368-79. Doi: 10.1016/j.ram.2015.09.005.

59. Fernandes C, Pereira S, Luiz M, Zuliani J, Furtado G, Stabeli R. Camelid Single-Domain Antibodies As an Alternative to Overcome Challenges Related to the Prevention, Detection, and Control of Neglected Tropical Diseases. Front Immunol. 2017;8:653. Doi: 10.3389/fimmu.2017.00653.

60. Pérez M, Gómez J, Dieguez R. Características clínico-epidemiológicas de la COVID-19. Rev habanera cienc médi. 2020;19 (2):1-15.

61. Serra M. COVID-19. De la patogenia a la elevada mortalidad en el adulto mayor y con comorbilidades. Rev habanera cienc médi. 2021;19(3).

62. Avila J. Coronavirus COVID-19; patogenia, prevención y tratamiento. 4ed. Lejona: salusplay; 2020. 19-25 p.

Anexos

Abreviaturas

Abs	Anticuerpos
α-Syn	Proteína alfa-sinucleína
AAV	Virus adenoasociados
AFP	Alfa-fetoproteína
Anti-VP6	Anticuerpos contra la proteína VP6
BACE1	Enzima que escinde la proteína precursora amiloide
BHE	Barrera hematoencefálica
CapG	Componente del citoesqueleto de actina
CAPNb2	Nanoanticuerpos disponibles para dianas de tumores en ratones
CD19 y CD20	Nanoanticuerpos biespecíficos en el linfoma de células B
CDR	Regiones de determinación complementaria
Células CAR-T	Células T con receptores quiméricos de antígenos
EA	Enfermedad de Alzheimer
ETEC	*Escherichia coli* enterotoxigénica
GMB	Glioblastomas
Ig	Inmunoglobulinas
IgNAR	Nanoanticuerpos de cadena pesada
nAbs	Nanoanticuerpos
NAC	Componente no amiloide
NbSyn87-PEST	Nanoanticuerpo bifuncional donde PEST es la región C terminal de la proteína
R3VQ	Virus VHH con capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo
SNC	Sistema nervioso central
US28	Receptor de quimiocinas
VH14-PEST	Nanoanticuerpo bifuncional donde PEST es la región del componente no amiloide
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VHH	Nanoanticuerpos de dominio simple derivado de camélidos

BY-NC-SA 4.0