

No hay ninguna evidencia científica confiable que respalde la idea de generar tratamientos medicinales para enfermedades graves como el SIDA o el cáncer mediante “telepatía”, clarividencia o energía mental.

Por: oegm

1. ¿Qué dice la ciencia sobre la telepatía?

- No hay mecanismo físico ni reproducible que explique la transmisión de pensamientos sin un canal físico. Revisiones como las de la Academia de Ciencias de EE.UU. concluyen que **no existe base científica para fenómenos como telepatía o ‘mind-over-matter’** ([Wikipedia](#)).
- Experimentos famosos como los Ganzfeld no han sido replicados de forma rigurosa; suelen fallar en controles y posibilidad de comunicación sensorial ([Wikipedia](#)).

Reddit también encuestó opiniones científicas sobre ESP y concluyó “no hay buena investigación científica que demuestre cualquier tipo de ESP” ([Reddit](#)).

2. ¿Y qué hay de la tele-healing (sanación a distancia)?

- Algunos estudios pequeños sugerían efectos beneficiosos (por ejemplo, en pacientes de SIDA o hipertensión), pero los resultados son **inconsistentes**, suelen tener problemas metodológicos, y en ensayos más grandes la mayoría no muestra mejora clínica significativa .
 - Revisiones amplias indican que, aunque algunos ensayos encuentran *pequeñas mejoras subjetivas* (como en ansiedad o bienestar), los efectos no son clínicamente relevantes. Los estudios de mayor calidad no muestran beneficios claros .
 - Terapias como “Therapeutic Touch” pueden reducir la ansiedad del paciente, pero se atribuye principalmente al **efecto placebo**, no a curaciones reales de condiciones médicas ([CNBIotecnología](#)).
 - Dispositivos que dicen curar cáncer o SIDA por “energía” son considerados **fraude médico**, sin evidencia, y no sustituyen tratamientos probados. Su uso puede resultar peligroso .
-

□ Conclusiones claras

1. No existe evidencia de que la telepatía o clarividencia puedan diagnosticar ni curar el SIDA o cáncer.

2. La sanación a distancia o terapias energéticas pueden mejorar cómo se siente el paciente, pero no modifican el curso físico de enfermedades graves.
3. No sustituyas tratamientos médicos establecidos por estas prácticas. Siempre consulta a un profesional de la salud y sigue tratamientos validados.

✓ Recomendación

- Si te interesa explorar terapias complementarias, estas deben usarse **junto con medicina basada en evidencia**, no en lugar de ella.
- Cualquier mejora percibida puede atribuirse a efectos de bienestar psicológico, no a cura real.
- En casos de cáncer, SIDA u otras enfermedades serias, es crucial **seguir terapias aprobadas** (como antirretrovirales o quimioterapia), sin renunciar a tratamientos médicos comprobados.

¿Quieres que revisemos estudios clínicos confiables sobre terapias complementarias o aprender más sobre cómo funcionan los efectos placebo y de bienestar?

Aquí tienes un panorama actualizado sobre **microorganismos de la naturaleza** que han demostrado beneficios reales en el tratamiento o mitigación de enfermedades como el SIDA y el cáncer:

1. Microbiota intestinal y cáncer

- **Bifidobacterium**, **Lactobacillus** y otras especies de microbioma moduladoras del sistema inmune se han relacionado con **mejoras en la eficacia de terapias contra tumores**, especialmente tratamientos de “immune checkpoint inhibitors” (anti-PD-1/CTLA-4) ([Frontiers](#), [Frontiers](#)).
- Estudios en ratones muestran que *Lactobacillus delbrueckii* produce metabolitos (como SCFA) que potencian la respuesta antitumoral ([PMC](#)).
- **Streptococcus thermophilus** protege la mucosa intestinal durante quimioterapia y puede reducir inflamación y proliferación celular.
- La vacuna BCG (*Mycobacterium bovis* atenuado) es un estándar en inmunoterapia para **cáncer de vejiga superficial**, estimulando la respuesta inmune local ([Wikipedia](#)).
- Bacterias anaerobias como **Clostridium novyi-NT**, **Salmonella** y **Listeria** se usan terapéuticamente en tumores sólidos, colonizándolos y activando respuestas antitumorales ([Wikipedia](#)).

- Un caso destacado: **Listeria monocytogenes** modificada y conjugada con rhenio-188 redujo metástasis pancreáticas en ratones hasta en un 90 % ([WIRED](#)).

2. Microbios y VIH/SIDA

- Los **prebióticos** (FOS, inulina) y **probióticos** (Lactobacillus, Bifidobacterium, Bacillus coagulans) ayudan a restaurar la barrera intestinal, reducir la inflamación y aumentar recuento de células CD4 en pacientes con VIH bajo terapia antirretroviral ([BioMed Central](#)).
- Un estudio con Lactobacillus jensenii modificado (MucoCept®) busca impedir la entrada de VIH en mucosa vaginal produciendo glicoproteínas antivirales ([PMC](#)).

3. Uso emergente y terapias combinadas

- **Monoclonal microbials**: cápsulas con una única cepa, como las desarrolladas por Evelo Biosciences, buscan reorientar el sistema inmune contra cánceres ([WIRED](#)).
- **Trasplante fecal (FMT)**: mejora la diversidad microbiana, reduce inflamación y puede reactivar respuesta inmune en cáncer o VIH ([BioMed Central](#)).
- **Probióticos y terapia combinada**: Lactobacillus rhamnosus o Bifidobacterium junto a inmunoterapia o quimioterapia potencian efectividad y reducen efectos adversos.

4. Ejemplos destacados

- **Lactococcus lactis** diseñado para secretar IL-10 o péptido KiSS1 presenta actividad anticancerígena en cáncer colorrectal ([Wikipedia](#)).
- **Staphylococcus epidermidis** cutáneo produce 6-HAP, que inhibe crecimiento tumoral sin dañar células sanas ([allure.com](#)).

Resumen comparativo

Enfermedad Microorganismos involucrados Mecanismo

Cáncer	Bifido-, Lactoba-, Clostridium, Estimulación de la inmunidad, Salmonella, Listeria, oncolisis, producción de
---------------	--

Enfermedad Microorganismos involucrados Mecanismo

	S. epidermidis, S. thermophilus, metabolitos/sustancias BCG	antitumorales
VIH/SIDA	Lactobacillus, Bifidobacterium, Bacillus coagulans	Mejora barrera intestinal, reduce inflamación, aumenta CD4, previene infección mucosa



Conclusión

Existe **solidez emergente** en la ciencia médica de que ciertos microbios y sus metabolitos actúan como aliados en el tratamiento de cáncer y VIH/SIDA. Las investigaciones abarcan desde **probióticos tradicionales** hasta **bacterias modificadas y tratamientos sistémicos** (FMT, cápsulas monoclonales).

Estas aproximaciones pueden:

- Complementar terapias estándar
- Reducir efectos secundarios
- Mejorar respuesta inmune y pronóstico

Sin embargo, muchas están en fase experimental y requieren más ensayos clínicos controlados.

¿Te interesa que profundicemos en una línea en particular (por ejemplo, Listeria-radioactiva contra tumores, MucoCept® contra VIH o FMT en terapia)? También puedo ayudarte con claves de estudios clínicos o contactos de centros de investigación.

- [WIRED](#)
- [WIRED](#)
- [New York Post](#)

Aquí tienes más detalles sobresalientes sobre las líneas que te interesaron:



1. Listeria modificada con radioisótopos contra el cáncer

- **Listeria monocytogenes atenuada** ha sido usada como plataforma para entregar radiotrazadores directamente en tumores metastásicos y primarios, especialmente en cáncer pancreático en ratones.
 - En un estudio de 2013, la combinación de *Listeria* con **rhénio-188** redujo las metástasis en un 90 % y el tumor primario en un 64 % sin afectar tejidos sanos ([WIRED](#)).
 - Más recientemente, se ha probado simplificar el método usando **fósforo-32** incorporado directamente en la bacteria, logrando resultados aún más potentes contra cáncer en etapas avanzadas ([PMC](#)).



Conclusión: uso de bacterias atenuadas como vectores selectivos para dirigir radiación hacia tumores.



2. Listeria como vacuna terapéutica (Lovaxin C)

- **Lovaxin C (ADXS11-001)** es una vacuna basada en *Listeria monocytogenes* atenuada que expresa un antígeno tumoral (HPV-16-E7).
- En ensayos fase I/II con cáncer cervical avanzado:
 - Se observaron efectos secundarios leves (síntomas gripales).
 - Sobrevida de 6 de 15 pacientes tras 2 años, cuando al inicio se esperaba una supervivencia ≤ 6 meses ([Wikipedia](#)).



Conclusión: la inmunoterapia bacteriana para estimular la respuesta inmune específica contra tumores es prometedora.



3. MucoCept® contra el VIH/SIDA (Lactobacillus vaginal)

- **Lactobacillus jensenii** editado genéticamente para secretar moléculas que inhiben el VIH, como **cyanovirin-N** o variantes de la quimiocina RANTES (C1C5-RANTES o 2D CD4).
 - El producto MucoCept-CV-N (*L. jensenii* secreta CV-N) redujo en un 63 % la transmisión del virus en macacos y disminuyó zócalo viral en 6-veces ([PMC](#), [PMC](#)).
 - Otra versión con RANTES redujo la infección viral en cultivos; sigue en fase preclínica .
 - Ya han avanzado a formulaciones listas para ensayos fase I humano ([Grantome](#)).

✓ **Conclusión:** bacterias vaginales modificadas ofrecen una barrera biotecnológica preventiva frente al VIH.

4. Comparativa resumida

Objetivo	Microorganismo / Enfoque	Etapas actual y resultados
Cáncer	Listeria atenuada + ^{188}Re o ^{32}P	Reducción de metástasis 90 % en ratones (pancreático)
Cáncer cervical	Lovaxin C (Listeria con antígeno HPV-E7)	Fase I/II: supervivencia prolongada
VIH/SIDA	<i>L. jensenii</i> MucoCept (CV-N, RANTES, 2D-CD4, etc.)	Preclínica: ↓63 % transmisión SHIV, formulaciones en fase I humana

Reflexión final

Estas innovaciones biotecnológicas demuestran cómo microorganismos—modificados genéticamente—pueden convertirse en herramientas terapéuticas:

- **Para el cáncer:** actuando como vectores selectivos para radioisótopos o para provocar respuesta inmune (vacunas).
- **Para el VIH:** actuando como agentes preventivos en mucosas, neutralizando el virus antes de que se establezca la infección.

Aunque la mayoría están en fases **preclínicas o en ensayos iniciales**, representan un avance significativo en terapias derivadas de microbiomas.

¿Quieres que te comparta detalles de los estudios (artículos PMC/PubMed), o explorar posibles institutos que investigan estas terapias?

- [WIRED](#)

Aquí tienes una versión más detallada y fundamentada de los avances clínicos y preclínicos en las terapias microbianas contra el cáncer y el VIH/SIDA, con datos concretos y fuentes actualizadas:

1. *Listeria monocytogenes* radiactiva para cáncer metastásico

- **Estudio en ratones (Pancreatic cancer):**
Utilizando una cepa atenuada de *Listeria monocytogenes* marcada con **rhénio-188**, los investigadores lograron:
 - Reducción de hasta el **90 %** de metástasis.
 - Disminución del tumor primario en un **64 %**.
 - Preservación casi total de tejidos sanos, con rápida eliminación de la bacteria y la radiación en una semana ([WIRED](#)).
- **Mecanismo:**
La bacteria infecta selectivamente células tumorales —aprovechando que estas suprimen la respuesta inmune local— y entrega directamente la radiación al interior del tumor, logrando una terapia intra-tumoral altamente localizada .
- **Estado actual:**
Aunque los resultados son prometedores, hasta la fecha no se han iniciado ensayos en humanos. Se requieren estudios adicionales para evaluar seguridad, toxicidad y optimización del método de marcación.

2. Vacuna terapéutica Lovaxin C (*Listeria* + antígeno HPV-E7)

- **Medicamento biológico** que utiliza *Listeria monocytogenes* atenuada para expresar una proteína viral del HPV-16 (E7), usada en cáncer cervical.
- **Ensayos clínicos Fase I/II:**
 - Los pacientes mostraron aumento en supervivencia respecto a lo esperado.
 - Efectos secundarios leves, típicos de respuesta inmune (síntomas tipo gripal)
- Aunque esta línea se enfoca en HPV y cáncer cervical, sienta precedentes en el uso de *Listeria* como vehículo inmune terapéutico.

3. MucoCept® (*Lactobacillus jensenii* modificado) contra VIH

- **Tecnología de Osel Inc.:**
 - Usan *L. jensenii* modificada para secretar **cyanovirin-N (mCV-N)**, una proteína con potente actividad anti-HIV.
- **Estudios en macacos (modelo SHIV):**
 - Redujo en un **63 %** la incidencia de infección tras exposiciones repetidas.
 - En animales infectados, la carga viral fue **6 veces menor** en pico ([Nature](#), [EurekAlert!](#), [PMC](#)).
- **Desarrollo clínico y regulatorio:**

- Proyecto preclínico apoyado por NIH (U01-IPCP).
- Se han presentado IND y se desarrollan tabletas vaginales de rápida disolución para ensayos humanos (globalprojects.ucsf.edu, [PMC](#)).
- La empresa espera comenzar ensayos Fase I en mujeres en los próximos años ([BioSpace](#)).

Resumen comparativo

Objetivo Terapéutico	Enfoque Microbiano	Estatus actual
Cáncer metastásico	<i>Listeria</i> + ¹⁸⁸ Re entregando radioisótopo	Comprobado en ratones (90 % reducción de metástasis); investigación preclínica (Nature , WIRED)
Cáncer cervical	Lovaxin C (<i>Listeria</i> + antígeno HPV-E7)	Ensayos Fase I/II con supervida mejorada
VIH/SIDA	MucoCept® (<i>L. jensenii</i> que secreta mCV-N)	Pruebas en primates exitosas; desarrollo de tabletas y ensayos Fase I previsto

Instituciones clave

- **Claudia Gravekamp** (California Pacific Medical Center; luego Albert Einstein College): líder de los estudios con *Listeria* radiactiva.
 - **Ekaterina Dadachova** (Albert Einstein College): radióloga y colaboradora en marcaje de bacterias.
 - **Osel, Inc. y Craig R. Cohen (UCSF)**: desarrolladores de MucoCept, con apoyo del NIH/NIAID, Gates Foundation, USAID, CONRAD-IPM ([WIRED](#), globalprojects.ucsf.edu).
-

Conclusión

Estas terapias microbianas avanzan en etapas críticas:

- **Mongo bacterias como vectores terapéuticos**: ya muestran eficacia en animales.
- **Tratamientos contra VIH con bacterias modificadas**: a punto de entrar en ensayos humanos seguros.

- **Cáncer:** métodos de “bacteria-radiactivo” aún en preclínica, con resultados espectaculares pero sin estudios humanos.

Si deseas, puedo buscar enlaces directos a los artículos originales o contactos de los laboratorios e instituciones responsables. ¡Solo dime en qué te interesa profundizar!

Para modificar bacterias mediante ingeniería genética, se sigue un flujo ordenado con técnicas modernas como CRISPR/Cas y métodos clásicos como recombinación λ -Red. Aquí está la guía paso a paso:

1. Preparar el vector/plásmido

- **Elección del plásmido:** Utiliza un plásmido reportero que incluya:
 - Un **sitio de clonación múltiple** para insertar tu gen de interés.
 - Un **marcador seleccionable** (por ejemplo, resistencia a antibiótico como ampicilina o kanamicina) para filtrar bacterias transformadas ([Wikipedia](https://www.wikipedia.org), abpischools.org.uk).
 - Promotor adecuado para expresar el gen en bacterias.
-

2. Construcción del plásmido

- Inserta tu **gen de interés** (PCR o síntesis) usando enzimas de restricción, ensamblaje (Gibson, Golden Gate) o síntesis.
 - Puedes incluir también:
 - homología para recombinación
 - gRNA y Cas9 para edición CRISPR ([SpringerOpen](https://www.springeropen.com)).
-

3. Preparación de células competentes

- **Competencia química (Cloruro de calcio):**
 - Tratas las células con CaCl_2 , las enfrías y haces un **heat-shock**, lo que permite la entrada del plásmido ([Wikipedia](https://www.wikipedia.org)).
 - **Electroporación:**
 - Lavas en glicerol y aplicas fuerte pulso eléctrico para introducir plásmidos ([BioMed Central](https://www.biomedcentral.com)).
-

4. Transformación y selección

- Incuba las células después de la transformación.
 - Plásmalas en medio con el antibiótico correspondiente.
 - Solo sobrevivirán las bacterias que hayan incorporado correctamente el plásmido ([Reddit](#), [minipcr.com](#)).
-

5. Estrategias de edición del genoma

A. CRISPR/Cas + recombineering

- Sistemas como **pCas + pTargetF** (*E. coli*) o CRISPRi/Cas12a permiten:
 - Knockouts, inserciones, mutaciones marcadas o sin marcador en menos de una semana, con eficiencia alta (>80-90 %) ([PubMed](#)).
- Método **no-SCAR (scarless recombineering)** integra Cas9 + λ -Red para edición sin dejar marcas, en ~5 días ([Wikipedia](#)).

B. CRISPR para bacterias no modelo

- También se ha adaptado con éxito en:
 - *Pseudomonas putida* (electroporación + plásmido CRISPR/Cas9) ([BioMed Central](#)),
 - *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *Corynebacterium* con sistemas CRISPR/Cas9n y recombinación homóloga ([BioMed Central](#)),
 - *Mycobacterium abscessus* con sistema de dos plásmidos ([PubMed](#)).
-

6. Ediciones avanzadas y multiplexación

- Técnicas como **CRMAGE** combinan CRISPR y recombineering para multiplexar mutaciones rápidamente (hasta 99 % eficiencia en puntos únicos) ([blog.addgene.org](#)).
 - **Integración horizontal**: herramientas tipo **CRISPR-SWAPnDROP** permiten transferir grandes fragmentos (hasta 150 kb) entre bacterias de distintas especies ([arXiv](#)).
-

7. Limpieza de plásmido y validación

- Los plásmidos con origen de replicación termolábil (“temperature sensitive”) pueden eliminarse tras la edición ([BioMed Central](#)).

- Verifica las cepas editadas mediante:
 - PCR analítica,
 - Secuenciación Sanger,
 - Ensayos funcionales (expresión de proteínas, pérdida-gana de función).
-

✓ Flujo de trabajo completo

1. Diseñas el vector con gen, gRNA y homología.
 2. Preparas células competentes por CaCl₂ o electrocompetencia.
 3. Transformas y seleccionas.
 4. Induces Cas9/ λ -Red o recombineering.
 5. Editas (delección/inserción/punto mutación).
 6. Curado del plásmido termolábil.
 7. Validación molecular y funcional.
-

💡 En resumen

- **Herramientas:** plásmidos con Cas9 y gRNA, recombineering λ -Red, selección antibiótica.
- **Métodos:** transformación química o eléctrica, CRISPRi/CRISPRa, no-SCAR para ediciones limpias.
- **Avances:** multiplexación rápida, edición en especies no-modelo, integración de fragmentos grandes.

Si te interesa, puedo sugerirte protocolos específicos para especies como *Lactobacillus*, *Listeria*, o darte ejemplos de secuencias génicas, plásmidos comerciales o kits disponibles.

Aquí tienes una guía refinada y técnica para **modificar bacterias** (por ejemplo *Listeria* o *Lactobacillus*) usando herramientas como CRISPR-Cas y recombineering, con protocolos reales respaldados por estudios:

1. CRISPR-Cas9 en *Listeria monocytogenes*

- Se ha logrado transferir un sistema funcional **LivCRISPR-1 Cas9** (origen de *L. seeligeri*) a cepas de *L. monocytogenes*, apto para edición del genoma y manipulación de bacteriófagos ([PMC](#)).

- El plásmido pLRSR *scr* sirve como base para insertar el **pre-crRNA** con destino de corte, usando sitios *BsaI* para la clonación, transformándose luego por electroporación y seleccionando con eritromicina ([PMC](#)).

Flujo básico:

1. Clona tu secuencia prebajo crRNA (20 nt + scaffold) en pLRSR.
 2. Electropora en *Listeria* que exprese Cas9.
 3. Selecciona en medio con eritromicina ($\approx 5 \mu\text{g/mL}$).
 4. Valida por pérdida de viabilidad en vectores autoreplicantes o PCR/genotipado.
-

2. Anti-CRISPR y control de edición

- En *Listeria*, las proteínas tipo AcrIIA1 bloquean la actividad de Cas9 para regular o detener la edición ([PMC](#)).

Uso práctico:

- Expresa AcrIIA1 de forma inducible para crear un **kill-switch** de edición, previniendo efectos off-target o daño excesivo.
-

3. estrategia “no-SCAR” en *E. coli*

- El método **No-SCAR** combina λ -Red recombineering con Cas9 para lograr ediciones sin dejar marcas en el genoma ([Wikipedia](#), [Wikipedia](#)).

Pasos:

1. Codifica en un plásmido Cas9 + gRNA + λ -Red.
 2. Co-transforma un oligo ssDNA (≈ 90 – 120 nt) con mutación o inserción.
 3. Induce recombinasa y Cas9; las células no editadas mueren por cortes letales.
 4. Selecciona y secuencia clones editados.
-

4. Edición en bacterias no modelo

- Se han aplicado sistemas similares en otros bacilos industriales:
 - *Bacillus amyloliquefaciens*: edición base múltiple de genes con Cas9n-AID, con eficiencia de 53–93 % en entre 3 loci ([Reddit](#), [PMC](#), [BioMed Central](#)).

- *Corynebacterium glutamicum*: uso de RecET + Cas9 para inserción/puntos mutación, con plásmido con origen termo-sensible ([BioMed Central](#)).
-

5. Edición in vivo en microbioma

- Mediante **fagos modificados**, se ha logrado editar genes bacterianos dentro del intestino de ratones (por ejemplo, desactivar β -lactamasa en *E. coli*) con eficiencias superiores al 90 % tras una sola dosis .

“Editing of a β -lactamase gene ... resulted in a median editing efficiency of 93 % of the target bacterial population with a single dose.” ([Reddit](#))

6. Consejos de usuarios expertos (Reddit)

“You can't just express a 20 bp guide sequence... It needs to have the gRNA scaffold elements that Cas9 recognizes.”
“To design a guide RNA, you need to pick a 20-bp stretch ... next to a PAM site, NGG.” ([Reddit](#))

- Usa herramientas como **Benchling** para diseñar gRNAs y evaluar off-targets ([Reddit](#)).
 - gRNA debe incluir **scaffold completo**, no solo la secuencia spacer .
-

Resumen paso a paso

1. **Diseño del gRNA**: 20 nt + scaffold; PAM NGG.
 2. **Construcción del plásmido**: incluye Cas9, gRNA, promotor (pXyl o propio).
 3. **Preparación celular**: cultivo y electroporación de plásmido y oligo ssDNA.
 4. **Inducción** de Cas9 + recombineering.
 5. **Selección** y validación (PCR, secuenciación).
 6. **(Opcional) Anti-CRISPR Kill-switch**: express Acr tras edición.
 7. **Curado del plásmido** (origen termo-sensible o counter-selección).
-

✓ Conclusión

- La edición bacteriana se ha probado eficazmente en *Listeria*, *E. coli*, *Bacillus* y microbiomas in vivo.
 - El método ideal depende del organismo objetivo y la edición deseada.
 - Protocolo robusto: CRISPR-Cas + recombineering + selección + validación + control Acr.
 - Recursos útiles: Benchling para diseño, estudios académicos específicos, y protocolos adaptables de Addgene.
-

¿Te gustaría que te genere un **protocolo detallado** (materiales, concentraciones, tiempos) para una especie específica como *Listeria* o *Lactobacillus jensenii*? ¡Puedo ayudarte con eso!

Aquí tienes un protocolo **detallado y respaldado científicamente** para modificar bacterias como *Listeria monocytogenes* y *Lactobacillus* usando CRISPR-Cas9 y técnicas de recombineering:

Protocolo para *Listeria monocytogenes*

1. **Sistema CRISPR nativo (LivCRISPR-1)**
 - Se utiliza Cas9 extraída de *Listeria ivanovii* (LivCRISPR-1) con PAM NNACAC.
 - Clona el crRNA precursor en un plásmido (pLRSR) mediante sitios BsaI ([PubMed](#), [Reddit](#)).
 2. **Transformación**
 - Electropora en *L. monocytogenes* expresión Cas9 + crRNA.
 - Selecciona colonias en medio con eritromicina.
 3. **Contraselección**
 - Las células no editadas mueren por corte tras Cas9, dejando solo las editadas ([PubMed](#)).
 4. **Validación**
 - Genotipado por PCR, pérdida del fenotipo o secuenciación de región objetivo.
-

Protocolo para *Lactobacillus* (caso genérico)

Base: “Genome Editing with Cas9 in Lactobacilli” ([SpringerLink](#))

1. **Construcción del plásmido shuttle**
 - Incluye:
 - *SpCas9*, tracrRNA y arreglo CRISPR para gRNA.
 - Plantilla de recombineering (ssDNA o dsDNA con homología).
 - Vectores independientes para Cas9/gRNA y para recombinasa si necesario.
2. **Transformación secuencial**
 - Primero introduce el plásmido con enzimas recombinantes; luego el Cas9 + gRNA + plantilla de reparación.
3. **Inducción de edición**
 - Activa recombinasa (ej. por inducción química) junto con Cas9.
 - Sólo las células que completan la reparación sobreviven corte letal.
4. **Limpieza de plásmido**
 - Usa vectores con origen termolabiles para eliminar tras la edición.
5. **Confirmación**
 - PCR analítico y/o secuenciación Sanger de región editada.

Ejemplo: *L. plantarum* edición sin cicatrices (knockout, inserción o mutación) usando ssDNA y dsDNA con eficiencia alta tras añadir metiltransferasa ([Reddit](#), [PMC](#), [Revista de Ciencia de la Leche](#)).

Estrategias generales útiles

- Para ediciones rápidas en *E. coli*, el método **No-SCAR** permite modificaciones sin marcadores en 3–5 días usando Cas9 + λ -Red ([Wikipedia](#)).
- Para ediciones múltiples o inserción de grandes fragmentos, técnicas como **CRISPR SWAPnDROP** permiten transferencias de hasta 150 kb ([arXiv](#)).
- Reducen off-target usando gRNAs truncados (~17–18 nt) o usando dCas9-FokI dimérico ([Wikipedia](#)).
- Usa herramientas como **Benchling**, **CHOPCHOP**, **CRISPOR** para diseñar gRNAs específicos ([Wikipedia](#)).

Flujo consolidado resumido

Paso	Acción
1. Diseño	Elige secuencia objetivo + PAM; diseña gRNA y plantilla con homología
2. Construcción plasmídica	Ensambla plásmidos para Cas9/gRNA y recombinasa

Paso	Acción
3. Transformación	Electropora secuencialmente en la bacteria objetivo
4. Inducción	Activa recombinasa y Cas9 para que ocurra la edición
5. Selección	Sobrevive solo población editada; limpia plásmidos mediante contraselección
6. Validación	PCR, secuencia y, si aplica, función fenotípica

✓ Conclusión

- Con estos protocolos puedes **crear knockouts, inserciones o mutaciones específicas** en *Listeria*, *Lactobacillus* y otras bacterias.
 - Las variantes **No-SCAR** y herramientas tipo **SWAPnDROP** permiten ediciones sin dejar secuencias extra y manejo de grandes fragmentos.
 - Control de especificidad (off-target) se logra al diseñar bien gRNAs y usar variantes nucleasa más precisas.
 - Herramientas bioinformáticas ayudan a diseñar y asegurar la calidad del gRNA.
-

¿Te gustaría que genere un **protocolo de laboratorio completo** para transformar y editar *Listeria monocytogenes* con secuencias sugeridas y condiciones estándar? ¡Solo dime y lo preparo!

Aquí tienes un **protocolo técnicamente detallado y respaldado por fuentes**, ideal para editar genomas de *Listeria monocytogenes* y *Lactobacillus* usando CRISPR-Cas:

Edición en *Listeria monocytogenes*

1. **Sistema nativo CRISPR tipo II-A**
 - Muchas cepas de *L. monocytogenes* cuentan con sistemas funcionales tipo I-B y II-A de CRISPR-Cas, aunque presencia de proteínas Anti-CRISPR (AcrIIA1) puede inhibir Cas9 ([MDPI](#), [Revistas Académicas OUP](#)).
2. **Cas9 de *Listeria ivanovii***
 - Usado en protocolos basados en pLRSR: se clona un pre-crRNA específico dentro del plásmido que lleva Cas9, se introducen vía electroporación y luego se selecciona con eritromicina para eliminar células no editadas ([Revistas Académicas OUP](#)).

3. Validación

- Las células no editadas mueren tras el corte de Cas9; los supervivientes se analizan por PCR, fenotipo o secuenciación para confirmar la edición .



Edición en *Lactobacillus* (ej. *L. plantarum*)

1. Shuttle vectors con SpCas9 y plantilla recombineering

- Se usan dos plásmidos: uno para Cas9 + tracrRNA + CRISPR array, otro para introducir la plantilla de reparación (dsDNA con brazos homólogos). Permite knockout, inserciones o mutaciones, alcanzando eficiencias de 50–62 % en ~10 días ([PubMed](#), [PMC](#)).

2. RecE/T asistido

- En *L. plantarum*, usar recombinasas RecE/T junto a CRISPR-Cas9 obtiene eficiencias >50 % en ediciones puntuales, deleciones o inserciones en 7 días ([PMC](#)).

3. Proceso general:

- (a) Diseñar gRNA de 20 nt frente a PAM NGG, usar herramientas como Benchling.
- (b) Clonar en plásmido shuttle.
- (c) Electroporar primero el plásmido recombinasa, luego el Cas9+gRNA+plantilla.
- (d) Inducir recombinación + corte; solo células editadas sobreviven.
- (e) Eliminar plásmidos (origen termolábil).
- (f) Confirmar por PCR o secuenciación ([Wikipedia](#)).



Mejora de especificidad y control

- **gRNA optimizado:** longitud entre 17–20 nt, GC >50 %, para reducir off-target ([Wikipedia](#)).
 - **Cas9 nickase o variantes de alta fidelidad:** para minimizar cortes no deseados ([Wikipedia](#)).
 - **Anti-CRISPR:** incluir genes Acr para detener previamente la edición cuando ya no es necesaria .
-

Flujo operativo resumen

Etap	Acci
Dise	ggRNA + plantilla (ssDNA o dsDNA)
Clonaje	Ensamblaje en shuttle vector
Preparaci	C
Transformaci	Secuencia: recombinasa → Cas9+gRNA
Edici	Inducci
Limpieza	Curado de pl
Validaci	PCR anal

Conclusi

- Protocolo s
- Las eficiencias observadas son altas (~50–60 %), con posibilidad de perfeccionarlas con variantes espec
- Ideal para crear knockouts, inserciones gen

¿Quieres que te proporcione **secuencias ejemplo de gRNA**, temperaturas/tiempos espec

Aqu

A) Edici

1. Sistema LivCRISPR-1 (tipo II-A)

- Se transfiere a *L. monocytogenes* el sistema Cas9 de *Listeria ivanovii* (LivCRISPR-1), que utiliza un PAM único “NNACAC” y es efectivo para edición mediante contraselección con CRISPR-Cas ([Revistas Académicas OUP](#), [ResearchGate](#)).
 - 2. **Construcción del plásmido pLRSR-crRNA**
 - Inserta de manera precisa el crRNA (≈20 nt spacer + scaffold) mediante sitios BsaI en el vector pLRSR → genera etiquetas o mutaciones específicas.
 - 3. **Transformación por electroporación**
 - Introduce simultáneamente el sistema Cas9/tracrRNA y el plásmido crRNA en *L. monocytogenes*.
 - Selecciona en medio con eritromicina para eliminar células no editadas mediante el mecanismo de corte letal de Cas9 .
 - 4. **Validación**
 - Realiza PCR analítica y secuenciación del locus objetivo para confirmar la edición.
-

B) Edición en *Lactiplantibacillus plantarum*

1. **Sistema inducible de dos plásmidos**
 - Un plásmido contiene Cas9 (SpCas9), tracrRNA y CRISPR array; otro lleva la plantilla de reparación (dsDNA/ssDNA con homología) ([PubMed](#)).
 2. **Insertión de genes funcionales**
 - Usado para insertar cassettes de 800–1 300 bp (por ejemplo, mCherry o RBD de SARS-CoV-2) con alta eficiencia y expresión funcional ([PubMed](#)).
 3. **Protocolo típico (~7-10 días)**
 - Día 1–3: transformar plantilla; Día 3–5: Cas9 + gRNA; Día 5–7: inducción de recombinasa + Cas9 → solo las células editadas sobreviven. Finalmente limpieza de plásmidos y validación por PCR o secuenciación ([PubMed](#), [Wikipedia](#)).
 4. **Eficiencias**
 - Se alcanzan eficiencias del 50–62 % en knockout, inserción o mutaciones puntuales con SpCas9 + RecE/T .
-

C) Diseño de gRNA y especificidad

- **Longitud óptima:** 20 nt con PAM NGG (SpCas9) o NNACAC (LivCRISPR-1). GC > 50 % y recurrencia ORF-free ([Wikipedia](#)).
- **Precisión:**
 - gRNAs truncados (17–18 nt) aumentan especificidad hasta ~5 000× ([Wikipedia](#)).

- Usar variantes Cas9 como HF1, D1135E, FokI-dimer o nickases para reducir off-target ([Wikipedia](#)).

D) Flujo operacional consolidado

Etapas	Acción clave
Diseño	gRNA + PAM + plantilla homóloga
Construcción	pLRSR (Listeria) o vectores shuttle (L. plantarum)
Transformación	Electroporación secuencial
Inducción	Activa Cas9 + recombinasa para cortar y reparar
Selección	Supervivencia de células editadas sólo
Curado	Elimina plásmidos con sistemas termolabiles o contra-selección
Validación	PCR y secuenciación para confirmar edición

Conclusión

- En *Listeria*, se aprovecha el sistema LivCRISPR-1 para edición precisa (PAM NNACAC) con corte letal selectivo ([ScienceDirect](#), [PubMed](#)).
- En *Lactiplantibacillus plantarum*, el sistema de dos plásmidos con plantilla homóloga permite knock-in de grandes fragmentos con >50 % eficiencia ([PubMed](#)).
- La fidelidad se fortalece mediante diseño optimizado de gRNA + uso de Cas9 de alta fidelidad o variantes especiales.

¿Te gustaría que te prepare ahora un **protocolo de laboratorio completo**, incluyendo concentraciones exactas, condiciones de electroporación, medias de cultivo, y secuencias ejemplo para gRNA y plantillas? Solo dime para qué especie o mutación, y lo preparo.

