

## Bacterioma en nódulos mamarios y sus efectos morfológicos sobre la línea celular del cáncer de mama

### Bacterioma in Mammary Nodules and Their Morphological Effects on Breast Cancer Cell Line

Katia Pertuz Yepes<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4194-3633>

Adriana Sierra Hernández<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6609-8421>

Israel Díaz Yunez<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5633-2280>

Javier Escobar Pérez<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0432-6978>

Eduardo De Nubbila<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7971-1494>

<sup>1</sup>Grupo de Proteómica y Genómica, Universidad Metropolitana. Barranquilla, Colombia.

<sup>2</sup>CEDIUL S.A.S. Imágenes diagnósticas y terapéuticas. Barranquilla, Colombia.

<sup>3</sup>Universidad del Bosque. Bogotá, Colombia.

\*Autor para la correspondencia: [kpertuz@unimetro.edu.co](mailto:kpertuz@unimetro.edu.co)

## RESUMEN

**Introducción:** En el cáncer de mama no se ha reportado una bacteria como causante, pero sí la presencia de diferentes especies que se relacionan de forma beneficiosa o perjudicial.

**Objetivo:** Identificar la microbiota presente en nódulos mamarios y sus efectos morfológicos sobre la línea celular MCF-7.

**Métodos:** Estudio exploratorio experimental de una población de 57 mujeres con nódulos mamarios, intervenidas para biopsia por punción en un centro de diagnóstico. De estas, se escogieron 17 muestras mediante muestreo no probabilístico para el análisis metagenómico. Se realizó una infección con células

MCF-7 y *Staphylococcus saprophyticus* a MOI de 1:1, 5:1 y 10:1 (48 horas de exposición).

**Resultados:** De las 57 muestras tomadas, solo en 7 pacientes se obtuvo resultado positivo (12,28 %) y en el resto (50) no hubo crecimiento bacteriano. Por metagenómica se obtuvo la microbiota siguiente: Proteobacteria (47 %), *Escherichia* (9,4 %) y *Yokenella* (8,2 %), entre otros. Los controles fueron negativos. Solo dos pacientes resultaron positivas para cáncer, entre ellas la especie común fue *S. saprophyticus*. En la infección, los cambios morfológicos se evidenciaron desde la MOI 5:1.

**Conclusión:** El bacterioma extraído de los nódulos de una población femenina es en su mayoría flora endógena del órgano mamario.

**Palabras clave:** bacterias; nódulos; metagenómico; MCF-7.

## ABSTRACT

**Introduction:** No bacterium has been reported as causative of breast cancer, but the presence of different species that are related in a beneficial or detrimental way.

**Objective:** To identify the microbiota present in breast nodules and its morphological effects on the MCF-7 cell line.

**Methods:** Exploratory, experimental study of a population of 57 women with breast nodules, operated for needle biopsy in a diagnostic center. Of these, 17 samples were chosen by non-probabilistic sampling for metagenomic analysis. Infection was performed with MCF-7 cells and *Staphylococcus saprophyticus* at MOI of 1:1, 5:1 and 10:1 (48 hours of exposure).

**Results:** Of the 57 samples taken, only 7 yielded positive results (12.28%) and the rest (50) had no bacterial growth. The following microbiota was obtained by metagenomics: Proteobacteria (47%), *Escherichia* (9.4%) and *Yokenella* (8.2%), among others. Controls were negative. Only two patients tested positive for cancer, and *S. saprophyticus* was the common species. In the infection, morphological changes were evidenced from MOI 5:1.

**Conclusion:** The bacteriome extracted from the nodules of a female population is mostly endogenous flora of the mammary glands.

**Keywords:** bacteria; nodules; metagenomics; MCF-7.

Recibido: 01/06/2021

Aceptado: 28/06/2021

## Introducción

La microbiota normal se considera la primera línea de defensa contra agentes patógenos, y normalmente se encuentra en un equilibrio dinámico con el huésped, pero cuando hay una disbiosis microbiana<sup>(1,2)</sup> aumenta el riesgo de desarrollar problemas de salud, incluso de desarrollar cáncer.<sup>(3)</sup>

Cada año las cifras del cáncer de mama aumentan, Globocan publicó que para el año 2018 fue la principal causa de muerte en mujeres (15 % anual), y para el 2020 una incidencia de 24,5 % y 16 % de muertes.<sup>(4,5)</sup>

Es importante destacar que las diferencias en la microbiota de las mujeres desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de esta enfermedad;<sup>(6)</sup> el análisis microbiológico tanto de la leche materna como del tejido mamario muestra que la mama aloja microbiota única y diversa,<sup>(7,8)</sup> una parte de esta microbiota podría provenir de bacterias derivadas del intestino. *Jost* y otros<sup>(9)</sup> plantearon la presencia de un eje intestino-seno a lo largo del cual las bacterias presentes en el intestino materno pueden alcanzar la glándula mamaria a través de una ruta endógena que involucra células dendríticas.<sup>(10,11,12)</sup>

Sin embargo, a pesar de los hallazgos reportados y la amplia información que existe, los autores no han sido concluyentes con respecto a que una bacteria sea causante del cáncer de mama, pero sí han afirmado la presencia de diferentes especies que se relacionan de forma benéfica o perjudicial.<sup>(13)</sup>

Esta investigación se hizo por medio de un análisis microbiológico y metagenómico con la finalidad de conocer la microbiota presente en nódulos mamario, y el

comportamiento morfológico (forma, tamaño y membrana) que experimenta la línea celular de cáncer de mama MCF-7 al ser infectada con una de las bacterias identificadas.

En la mayoría de las publicaciones las muestras provienen de mastectomía y lumpectomía, y hay muy pocos trabajos a partir de biopsias mamarias.<sup>(7,10,13,14,15,16,17,18)</sup> Estos estudios han sido posibles con el uso de tecnologías de secuenciación de nueva generación.<sup>(19)</sup>

## Métodos

Se realizó un estudio exploratorio experimental de una población de 57 mujeres con nódulos mamarios, pero sin síntomas clínicos de infección, intervenidas para biopsia por punción en CEDIUL S.A.S. Esta muestra fue tomada por conveniencia en una ventana de observación de 9 meses, y solo 17 muestras fueron escogidas al azar por medio de un muestreo no probabilístico para el análisis metagenómico. Para cultivo bacteriano se analizó la totalidad.

Como criterios de inclusión se tuvo en cuenta a mujeres mayores de 18 años, con presencia de nódulo mamario. Se excluyó a las pacientes expuestas a tratamiento con antibiótico inferior a un mes, presencia de lesión líquida, tratamiento de quimioterapia o radioterapia.

Después se procedió al diligenciamiento de una encuesta de datos personales y clínicos, y a la firma del consentimiento informado (aprobados por el comité científico y de ética de la Universidad Metropolitana y CEDIUL).

En el procedimiento estadístico se realizó una tabla de frecuencia y un análisis de regresión logística.

### *Toma de muestras:*

- **Controles:** En la piel y productos de asepsias se tomó con hisopo estéril, para control ambiental, y se empleó una caja de agar sangre abierta en el área de radiología.

- Tejido mamario: Se tomó de la primera punción, y bajo condiciones de esterilidad. Se conservó una parte con medio tioglicolato y la otra en tubo de microcentrífuga a -20 °C.

*Evaluación de la calidad del ADN total bacteriano:* Para la extracción de ADN se utilizó QIAamp PowerFecal ADN (Quiagen) bajo cabina de bioseguridad y recomendaciones del fabricante.<sup>(20)</sup> Luego se cuantificó mediante espectrofotometría a 230; 260 y 280 nm.<sup>(21)</sup> Las relaciones de absorbancias (260/280-260/230) indican la presencia de diferentes contaminantes, ARN y proteínas, fenol y sales, y polisacáridos, respectivamente.<sup>(22)</sup>

*Amplificación:* se emplearon los cebadores:<sup>(23)</sup>

- 16SrnaAS: ATGGTGTGACGGGCGGTGTG
- 16SrnaS: GGAGGAAGGTGGGGATGACG

*Condiciones de PCR:* 1 U de la enzima Taq Polimerasa (Thermo), buffer ADN polimerasa (1X), dNTP's (200 µM), H<sub>2</sub>O DEPC, iniciadores (0,4 µM) y aproximadamente 50 ng de ADN plantilla, todo a un volumen final de 20 µL, un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, 25 ciclos de 94 °C por 5 s, 55 °C por 1 min, y una extensión final a 72 °C por 10 min (termociclador Biorad).

*Construcción de librería y análisis informático:* Se inició con la amplificación de la región V3-V4 (341F-805R) del ARN ribosomal 16S, seguido de una construcción de la librería Herculase II Fusion ADN polymerase Nextera XT, Paired-end (la polimerasa es: KAPA HiFi HotStart ADN Polymerase). Luego se hizo una secuenciación usando la plataforma Miseq de Illumina (la longitud de las lecturas es de aproximadamente 300 bp 100 000 lecturas por muestra), ensamblaje de las lecturas por medio del programa FLASH (Fast Adjustment of Short reads), y preprocesamiento, seguido de la filtración de las lecturas, y corte de las secuencias de los adaptadores. Por último, se realizó la asignación taxonómica usando el programa QIIME2.<sup>(24)</sup>

Se usan las secuencias representativas de cada OTU para asignar la taxonomía (a nivel de especie).

Cebadores:

- 341F: CCTACGGGNGGCWGCAG.
- 805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC.

*Identificación bacteriana:* Inicialmente se realizó una siembra en estría por agotamiento en agar sangre, chocolate y MacConkey, seguido por la lectura y respectiva identificación en el equipo Phoenix 100 (Becton Dickinson).<sup>(25)</sup> Por último, se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la infección celular.<sup>(26)</sup>

*Estandarización de las MCF-7:* Para iniciar el cultivo celular *in vitro*, se descongelaron las células en Baño María a  $37^{\circ}\text{C}$ , y se siguió el procedimiento estandarizado.<sup>(27)</sup>

*Determinación de la curva de crecimiento y viabilidad celular (MTT):* Se realizó para definir la densidad del cultivo, el porcentaje de viabilidad y el día que el cultivo de MCF-7 alcanzaba la fase exponencial para la infección, es decir, el día que las células están metabólicamente activas.

*Estandarización del cultivo bacteriano:* Se realizó según Jasón Letoumeau.<sup>(28)</sup> Se tuvo en cuenta que la multiplicidad de infección (MOI) puede variar entre 100:1 y 1:10.<sup>(29)</sup> Una MOI muy superior o muy baja produce mayor variabilidad y las bacterias tienden a pegarse al fondo de la caja, por lo tanto, se inició en una MOI 1:1 que representa una probabilidad de infección del 63,2 %, <sup>(30)</sup> y las células MCF-7 permanecieron constantes a 800 000 (Tabla 1).

Se emplearon tiempos de infección de 4 h y 24 h con *S. aureus*, y visualización en el microscopio de campo invertido: no se observó cambio en su morfología y la cantidad permaneció estable. Por tal motivo no se realizó el ensayo de viabilidad por MTT y se descartó este tiempo para la infección.<sup>(31)</sup> Entonces se procedió a la infección, la bacteria se encontraba a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y para descongelarla se hizo un raspado en la parte superior del tubo con un asa estéril, se sembró directamente sobre la caja de agar sangre y se esperó de 24 a 48 h para el crecimiento óptimo.

Las lecturas del MTT se realizaron a 570 nm porque el formazán es un compuesto altamente cromógeno y la medición de su absorbancia produce resultados reproducibles a esta longitud de onda.<sup>(32,33)</sup>

**Tabla 1 - Estandarización del cultivo bacteriano<sup>(30)</sup>**

MOI	N.º de bacterias	Probabilidad de infección (%)	µL bacterias (MacFarland)
1:1	800 000	63,2	8
2:1	1 600 000	86,5	16
3:1	2 400 000	95	24
4:1	2 800 000	98,2	28
5:1	3 200 000	99,3	32
6:1	4 000 000	99,8	40
7:1	4 800 000	100	48
8:1	5 600 000	100	56
9:1	6 400 000	100	64
10:1	7 200 000	100	72

*Infección celular:* Ya estandarizados ambos cultivos, se sembraron las células MCF-7 con condiciones de crecimiento favorable hasta lograr una confluencia del 80 %; luego se infectaron (Tabla 2). Después de 48 h, se visualizaron las características morfológicas por microscopio invertido.

**Tabla 2 - Relación de células-bacterias en la infección**

MOI	N. de MCF-7	µL bacterias (MacFarland)	Probabilidad de infección (%)
1:1	350 000	3,5	63,2
5:1	1 750 000	17,5	99,3
10:1	3 500 000	35	100

*Análisis estadístico:* Se tabularon los datos obtenidos en la encuesta, se aplicó el análisis estadístico usando Stagraphics. Se calculó el porcentaje de crecimiento bacteriano total y se estableció el modelo de regresión logística para explicar cómo se modifica la variable dependiente, cuando cambian las independientes.

## Resultados

*Extracción del ADN total bacteriano:* Se obtuvo un ADN poco concentrado que cumplió los parámetros de pureza (Tabla 3). Cabe resaltar que estas muestras incluyen ADN humano (tejido mamario) y bacteriano.

Con la PCR se obtuvo un fragmento de aproximadamente 240 pb del ADN ribosomal 16S para las 17 muestras analizadas.

**Tabla 3 - Concentración y pureza del ADN bacteriano**

N.º muestra	Cuantificación (ng/µL)	260/280	260/230
1	21,2	1,8	1,9
2	53,1	1,8	1,9
3	1,9	1,9	1,8
4	7	1,8	1,7
5	16,2	1,7	1,7
6	7,8	1,7	1,8
7	8,2	1,7	1,8
8	11	1,7	1,9
9	12,1	1,8	1,9
10	94,7	1,9	1,7
11	11,7	1,9	1,7
12	11,4	1,8	1,7
13	4,3	1,7	1,9
14	7,4	1,7	1,8
15	6,4	1,6	1,8
16	20	1,7	1,7
17	9,4	1,8	1,7

*Bacterioma a nivel de Phylum:* A pesar de la baja cantidad del ADN obtenido en la extracción, se obtuvo una amplia diversidad bacteriana en cada muestra, el *phylum* más predominante fue Proteobacteria (47,0 %) y Firmicutes (26,4 %) y en menor proporción Bacteroidete (9,8 %) y Actinobacteria (8,7 %).

*Bacterioma a nivel de género:* Entre los géneros se encuentran de mayor a menor abundancia: *Escherichia* 9,4 %, *Yokenella* 8,2 %, *Streptococcus* 5,9 %, *Staphylococcus* 5,2 %, *Prevotella* 5 %, *Methylobacterium* 3,3 %, *Pseudomonas* 2,6

%, *Burkholderia* 2,6 %, *Ralstonia* 2,6 %, *Acinetobacter* 1,9 % y *Bacteroides* 1,7 %, entre otros.

Estas especies se asocian en proporciones similares en ambos grupos de pacientes, nódulos malignos y benignos, indicando que no hay diferencias significativas en ambos grupos.

**Identificación microbiológica:** En la tinción de Gram se observó para la mayoría de las muestras cocos en racimos y en tétradas, lo que indicó la presencia del género *Staphylococcus* en mayor abundancia.

La mayoría de los aislamientos crecieron en agar sangre y chocolate, a la vez, colonias de forma y aspecto diferentes; se hicieron repiques y posteriormente la identificación de las colonias ya purificadas (Tabla 4). En controles de piel, productos de asepsia y ambiental no se obtuvo crecimiento.

Solo dos pacientes resultaron con patología positiva para cáncer, entre ellas la bacteria común fue el *S. saprophyticus*, por lo tanto, fue la escogida para la infección celular.

**Tabla 4-** Identificación bacteriana por Phoenix 100

No. muestra	Patología	Bacteria
7	Maligno	<i>S. hominis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. kloosi</i> , <i>Corynebacterium urealyticum</i>
24	Benigno	<i>Micrococcus lylae</i>
25	Benigno	<i>Corynebacterium urealyticum</i>
28	Benigno	<i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. epidermidis</i>
33	Benigno	<i>S. hominis</i> , <i>S. epidermidis</i>
35	Maligno	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>S. saprophyticus</i>
37	Benigno	<i>Pseudomonas putida</i>

**Curva de crecimiento MCF-7 por ensayo de viabilidad MTT:** La fase exponencial se determinó para el día quinto (Fig. 1), por lo tanto, se realizaron las infecciones este día.

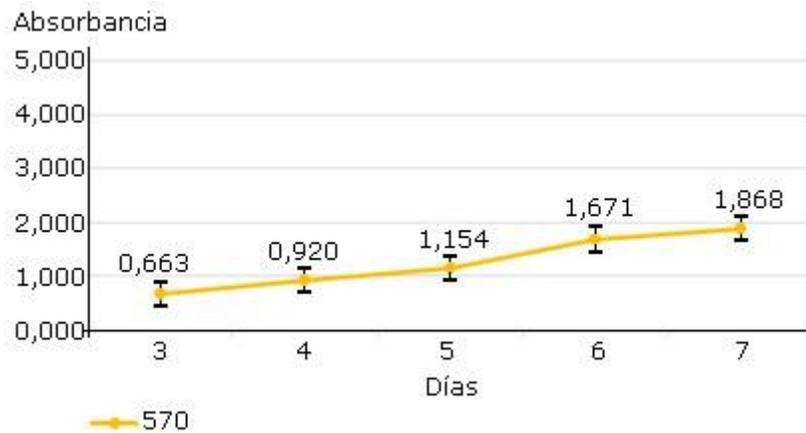


Fig. 1- Curva de crecimiento y viabilidad celular MTT.

*Cambios morfológicos luego de la infección:* En la infección se obtuvo que a una MOI de 1:1 no se evidenciaron cambios en su morfología, y fueron muy parecidas a las células control MCF-7 (Fig. 2A).

A una MOI 5:1 se observa un comportamiento diferente, presencia de filopodias (prolongaciones delgadas de la membrana, altamente dinámicas que se extienden desde el borde de la célula), las células aumentaron en número y tamaño, crecían muy juntas con forma redonda y con núcleos contraídos (Fig. 2B).

A una MOI de 10:1 los cambios fueron más pronunciados, las filopodias crecieron en la mayoría de las células, deformadas completamente, no se observó el contenido celular al interior de esta, ausencia de membrana celular, células separadas unas de otras por la muerte que experimentaban poco a poco a causa de la concentración de la bacteria (Fig. 2C).

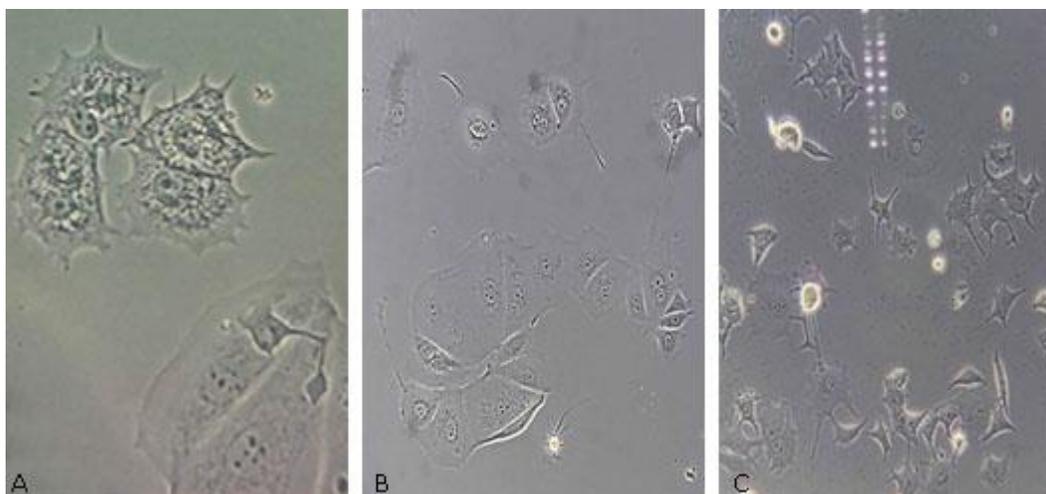


Fig. 2 - Comportamiento de las células MCF-7 infectadas con *S. saprophyticus*.

**Análisis estadístico:** De las 57 muestras tomadas, solo 7 pacientes dieron resultado positivo 12,28 % y en el resto (50) no hubo crecimiento bacteriano, lo que representó el 87,72 % del valor total.

No fue posible generar un modelo de regresión logística que asociara las variables de estudio con *S. saprophyticus*, porque ninguna de las variables independientes mostró una relación estadísticamente significativa, presentando valores de p mayores que 0,05 (Tabla 5).

Tabla 5 - Pruebas de razón de verosimilitud

Factor	Chi cuadrado	Gl	Valor p
Edad	0,254545	1	0,6139
Peso (kg)	0,681772	1	0,4090
Antecedentes de cáncer	2,79792	1	0,0944
Resultado	0,542136	1	0,4615

Variable dependiente: *S. saprophyticus*.

Factores: edad, peso (kg), antecedentes de cáncer, resultado de la patología.

## Discusión

Entre los resultados obtenidos en este trabajo radican en que el *phylum* más predominante fue Proteobacteria (47 %), seguido de Firmicutes (26,4 %) y en menor proporción Bacteroidetes (9,8 %) y Actinobacteria (8,7 %), resultado que concuerda

con *Xuan*<sup>(7)</sup> y *Urbaniak*,<sup>(16)</sup> donde describieron una comunidad caracterizada por el *phylum* Proteobacteria y Firmicutes, mientras que *Hieken*<sup>(15)</sup> encontró un predominio de Bacteroidetes y muy poco Proteobacteria.

*Urbaniak*<sup>(6)</sup> en el 2014 publicó Proteobacterias y Firmicutes como los *phylum* más abundantes en el tejido mamario en mujeres de Canadá e Irlanda, con y sin cáncer. Asimismo, *Srikantha Thyagarajan* en el año 2020, encontró los mismos *phylum*, y fue Proteobacteria el más abundante.<sup>(34)</sup>

Nuestros resultados coincidieron con que hubo mayor similitud que diferencia entre la microbiota de los pacientes, resultado que concuerda con lo reportado por *Lara Costantini*<sup>(18)</sup> y *Shen Meng*<sup>(17)</sup> con la del género *Ralstonia* y *Methylobacterium* de la comunidad Mediterránea, y el género *Methylobacterium* y *Bacteriodete* de la población china, respectivamente. Estos autores caracterizaron la microbiota del tejido mamario con muestras extraídas por biopsia, técnica igual a la usada para este proyecto.

También se coincidió con los resultados de *Srikantha Thyagarajan* en el año 2020, para quien los géneros *Ralstonia* y *Staphylococcus* fueron los más abundantes.<sup>(34)</sup>

Probablemente, estas similitudes se deben a la técnica empleada (metagenómica),<sup>(35,36,37)</sup> que permite identificar microorganismos que no son fácilmente cultivables.<sup>(38)</sup>

Las dos pacientes positivas con cáncer (Tabla 4) mostraron crecimiento bacteriano de Enterobacterias y *Staphylococcus*, resultado muy parecido a lo mostrado por *Urbaniak*<sup>(6)</sup> cuando encontró que el 30,8 % y 12,7 % de estas especies, respectivamente, estaban presentes en pacientes irlandesas con cáncer de mama. *Urbaniak*<sup>(16)</sup> también indicó que el *Staphylococcus* fue uno de los taxones que encontraron con mayor abundancia en pacientes con cáncer de mama respecto a controles sanos.

La mayoría de las bacterias aisladas y purificadas en el cultivo bacteriano (Tabla 4) fueron grampositivas, lo que coincide con *Kofteridis*<sup>(39)</sup> que indicó que desempeñan un papel importante como agentes causantes de infecciones de la piel y los tejidos blandos.

Las muestras número 7 y 35 presentaron una microbiota que coincide con los resultados publicados por *Urbaniak*:<sup>(6)</sup> de 43 muestras canadienses cultivadas, identificó ocho cepas diferentes, entre ellas el *S. saprophyticus*, el cual hace parte de los estafilococos coagulasa negativos, considerados flora residente del ser humano y no dañina para los pacientes sanos. Sin embargo, han sido reconocidos como agentes etiológicos de procesos infecciosos para el hospedero con sistema inmunitario comprometido.

Hay investigaciones que muestran los cambios morfológicos que sufren las células *in vitro* cuando son infectadas por bacterias, como es el caso de *Ludmila Alekseeva*<sup>(40)</sup> en el año 2013 cuando investigó el efecto citopático de las cepas de *S. aureus* de origen humano y animal y su capacidad para afectar el ciclo de la célula hospedadora en líneas celulares de células epiteliales HeLa y MAC-T bovina. La invasión de *S. aureus* ralentizó la proliferación celular e indujo un efecto citopático, lo que resultó en el agrandamiento de las células huésped. Ellos observaron una disminución dramática en el número de células mitóticas en los cultivos infectados.

En este estudio se intentó demostrar que las células MCF-7 tienen su comportamiento bien marcado a partir de la infección con *S. saprophyticus* a las 48 h con una MOI de 1:1, 5:1 y 10:1, obtuvimos como mayor efecto la formación de filopodias o lamelipodias en las células. Estas prolongaciones aparecen cuando las células están incubadas con alguna bacteria que las perturbe.<sup>(40,41,42)</sup> Esta observación podría llevar a más ideas en la patogenicidad de las infecciones mamarias recurrentes donde está presente esta especie.

## Conclusiones

El bacterioma encontrado en los nódulos es en su mayoría flora endógena de la mama. Al hacer comparaciones de nuestros resultados con la bibliografía, se infiere que en procesos tempranos se encuentra la flora normal y en procesos avanzados permanece, pero de forma aumentada, y se modifica cuando existen procesos infecciosos asociados.

Con respecto a la infección celular (MCF-7 y *S. saprophyticus*), las filopodias observadas aparecen cuando las células están perturbadas por un agente externo, lo que podría llevar a pensar sobre la patogenicidad de esta especie sobre la mama. Con la metodología planteada no podemos ser concluyentes si la bacteria promueve o da un microambiente que favorece el crecimiento tumoral o, al contrario, si el tumor propicia las condiciones para que ellas proliferen. Probablemente en procesos avanzados se da la interacción de diferentes especies microbianas.

### Agradecimientos

Gratitud hacia la Universidad Metropolitana por la financiación 100% del proyecto, a Cediul por las muestras suministradas de las pacientes y la Universidad del Bosque por las pruebas analíticas realizadas.

### Referencias bibliográficas

1. Bhatt AP, Redinbo MR, Bultman SJ. The role of the microbiome in cancer development and therapy. *CA Cancer J Clin.* 2017 [Acceso 15/01/2021];67 (4):326-44. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5530583/>
2. Mikó E, Kovács T, Sebő É, Tóth J, Csonka T, Ujlaki G, *et al.* Microbiome – Microbial Metabolome– Cancer Cell Interactions in Breast Cancer –Familiar, but Unexplored. *Cells.* 29 de marzo de 2019 [Acceso 18/03/2021];8(4). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6523810/>
3. Chen J, Douglass J, Prasath V, Neace M, Atrchian S, Manjili MH, *et al.* The microbiome and breast cancer: a review. *Breast Cancer Res Treat.* 2019 [Acceso 15/01/2021];178(3):493-6. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10549-019-05407-5>
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 [Acceso 10/12/2020];68(6):394-

424. Disponible en:  
<https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21492>
5. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2020 [Acceso 18/03/2021]. Disponible en:  
<https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21660>
6. Urbaniak C, Cummins J, Brackstone M, Macklaim JM, Gloor GB, Baban CK, *et al.* Microbiota of Human Breast Tissue. Macfarlane GT, ed. *Appl Environ Microbiol.* 2014 [Acceso 18/12/2020];80(10):3007. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4018903/>
7. Xuan C, Shamonki JM, Chung A, DiNome ML, Chung M, Sieling PA, *et al.* Microbial Dysbiosis is Associated with Human Breast Cancer. Takabe K, ed. *PLoS ONE.* 2014 [Acceso 18/12/2020];9(1):e83744. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3885448/>
8. Donnet-Hughes A, Perez PF, Doré J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, *et al.* Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *Proc Nutr Soc.* 2010 [Acceso 18/12/2020];69(3):407-15. Disponible en:  
<https://www.cambridge.org/core/journals/proceedings-of-the-nutrition-society/article/potential-role-of-the-intestinal-microbiota-of-the-mother-in-neonatal-immune-education/C780F421FFBA3653238EF9E7C23EAA08>
9. Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Rochat F, Chassard C. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding: Mother-neonate bacterial transfer. *Environ Microbiol.* 2014 [Acceso 09/01/2021];16(9):2891-904. Disponible en:  
[https://www.researchgate.net/publication/256608536\\_Vertical\\_mother-neonate\\_transfer\\_of\\_maternal\\_gut\\_bacteria\\_via\\_breastfeeding](https://www.researchgate.net/publication/256608536_Vertical_mother-neonate_transfer_of_maternal_gut_bacteria_via_breastfeeding)
10. Wang H, Altemus J, Niazi F, Green H, Calhoun BC, Sturgis C, *et al.* Breast tissue, oral and urinary microbiomes in breast cancer. *Oncotarget.* 2017 [Acceso 19/12/2020];8(50):88122-38. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5675698/>

11. Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UME, Beck DL, Abdo Z, *et al.* Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. *Plos One*. 2011 [Acceso 19/12/2020];6(6):e21313. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3117882/>
12. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, *et al.* Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*. 2001 [Acceso 27/01/2021];2(4):361-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11276208/>
13. Parida S, Sharma D. The power of small changes: Comprehensive analyses of microbial dysbiosis in breast cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 2019 [Acceso 22/01/2021];1871(2):392-405. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8769497/>
14. Chan AA, Bashir M, Rivas MN, Duvall K, Sieling PA, Pieber TR, *et al.* Characterization of the microbiome of nipple aspirate fluid of breast cancer survivors. *Sci Rep*. 2016 [Acceso 18/03/2021];6(1):28061. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4914981/>
15. Hieken TJ, Chen J, Hoskin TL, Walther-Antonio M, Johnson S, Ramaker S, *et al.* The Microbiome of Aseptically Collected Human Breast Tissue in Benign and Malignant Disease. *Sci Rep*. 2016 [Acceso 01/12/2020];6(1):30751. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4971513/>
16. Urbaniak C, Gloor GB, Brackstone M, Scott L, Tangney M, Reid G. The Microbiota of Breast Tissue and Its Association with Breast Cancer. *Appl Environ Microbiol*. 2016 [Acceso 18/12/2020];82(16):5039-48. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4968547/>
17. Meng S, Chen B, Yang J, Wang J, Zhu D, Meng Q, *et al.* Study of Microbiomes in Aseptically Collected Samples of Human Breast Tissue Using Needle Biopsy and the Potential Role of in situ Tissue Microbiomes for Promoting Malignancy. *Front Oncol*. 2018;8:312. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00318>
18. Costantini L, Magno S, Albanese D, Donati C, Molinari R, Filippone A, *et al.* Characterization of human breast tissue microbiota from core needle biopsies through the analysis of multi hypervariable 16S-rRNA gene regions. *Sci Rep*. 2018

- [Acceso 23/11/2020];8(1):16893. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-35329-z>
19. Metzker ML. Sequencing technologies –the next generation. Nat Rev Genet. 2010 [Acceso 23/11/2020];11(1):31-46. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrg2626>
20. QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit - QIAGEN Online Shop. [Acceso 19/03/2021]. Disponible en: <https://www.qiagen.com/co/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-powerfecal-pro-dna-kit/?clear=true#orderinginformation>
21. Vesty A, Biswas K, Taylor MW, Gear K, Douglas RG. Evaluating the Impact of DNA Extraction Method on the Representation of Human Oral Bacterial and Fungal Communities. Plos One. 2017 [Acceso 18/01/2021];12(1):e0169877. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0169877>
22. Ning J, Liebich J, Kästner M, Zhou J, Schäffer A, Burauel P. Different influences of DNA purity indices and quantity on PCR-based DGGE and functional gene microarray in soil microbial community study. Appl Microbiol Biotechnol. 2009 [Acceso 23/11/2020];82(5):983-93. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-009-1912-0>
23. Herlemann DP, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. ISME J. 2011 [Acceso 23/11/2020];5(10):1571-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3176514/>
24. Kuczynski J, Stombaugh J, Walters WA, González A, Caporaso JG, Knight R. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. Curr Protoc Bioinformatics. 2011 Dec; Chapter Unit 10.7. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1007s36>
25. Fagundo-Sierra R, Cerros-Santos MA, Pérez-Jáuregui J. Evaluación del instrumento automatizado Phoenix en la identificación y antibiograma de bacterias de origen clínico. Bioquímica. 2007 [Acceso 19/03/2021];32(2):39-48. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2007/bq072b.pdf>

26. Corrales Ramírez L, Sánchez Leal L. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Nova. 2005 [Acceso 11/12/2020];3(4):21. Disponible en: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/333/1208>
27. SOP Thawing, Propagating and Cryopreserving of NCI-PBCF-HTB22 (MCF-7). March 1, 2012; Version 1.5. [Acceso 19/03/2021]. Disponible en: [https://www.downloads/NCI-PBCF-HTB26\\_MDA-MB-231\\_SOP-508.pdf](https://www.downloads/NCI-PBCF-HTB26_MDA-MB-231_SOP-508.pdf)
28. Letourneau J, Levesque C, Berthiaume F, Jacques M, Mourez M. In Vitro Assay of Bacterial Adhesion onto Mammalian Epithelial Cells. J Vis Exp. 2011 May;(51):2783. DOI: <https://doi.org/10.3791/2783>.
29. Shabram P, Aguilar-Cordova E. Multiplicity of Infection/Multiplicity of Confusion. Mol Ther. 2000 [Acceso 19/03/2021];2(5):420-1. Disponible en: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1525-0016%2800%2990212-0>
30. Knipe DM, Howley PM. Fields' Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. 3116 p.
31. Gutiérrez LA, Agudelo DA. Control del crecimiento *in vitro* sobre cepas Gram positivas y Gram negativas productoras de mastitis. Rev LASALLISTA Investig. 2009 [Acceso 11/03/2021];6(1):67-74. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rlsi/v6n1/v6n1a09.pdf>
32. AnimCellCulture\_Guide.pdf [Internet]. [Acceso 19/03/2021]. Disponible en: <https://www.atcc.org/resources/culture-guides/animal-cell-culture-guide>
33. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983 [Acceso 2/03/2021];65(1):55-63. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0022175983903034?via%3Dihub>
34. Thyagarajan S, Zhang Y, Thapa S, Allen MS, Phillips N, Chaudhary P, *et al.* Comparative analysis of racial differences in breast tumor microbiome. Sci Rep. 2020 [Acceso 2/03/2021];10(1):14116. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7445256/>

35. Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM, *et al.* Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*. 2004 [Acceso 22/02/2021];428(6978):37-43. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature02340>
36. Lu X, Zhang X-X, Wang Z, Huang K, Wang Y, Liang W, *et al.* Bacterial Pathogens and Community Composition in Advanced Sewage Treatment Systems Revealed by Metagenomics Analysis Based on High-Throughput Sequencing. *Plos One*. 2015 [Acceso 22/02/2021];10(5):e0125549. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0125549>
37. Altarejos PI. Comparación de estrategias metagenómicas en muestras ambientales de biofilms. Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP) - Fundación para la Investigación Sanitaria y Biomédica en la Comunidad Valenciana (FISABIO). Valencia; 2015. [Trabajo Final de Grado]. Disponible en: <https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/56314/IZQUIERDO-Metagen%C3%B3>
38. Streit WR, Schmitz RA. Metagenomics -the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2004 [Acceso 22/02/2021];7(5):492-8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527404000967?via%3Dihub>
39. Kofteridis DP, Valachis A, Koutsounaki E, Maraki S, Mavrogeni E, Economidou FN, *et al.* Skin and Soft Tissue Infections in Patients with Solid Tumours. *Sci World J*. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1100/2012/804518>
40. Alekseeva L, Rault L, Almeida S, Legembre P, Edmond V, Azevedo V, *et al.* *Staphylococcus aureus*-Induced G2/M Phase Transition Delay in Host Epithelial Cells Increases Bacterial Infective Efficiency. *Plos One*. 2013 [Acceso 19/03/2021];8(5):e63279. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3662696/>
41. Szabados F, Kleine B, Anders A, Kaase M, Sakıncı T, Schmitz I, *et al.* *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 is internalized into human urinary bladder carcinoma cell line 5637. *FEMS Microbiol Lett*. 2008 [Acceso 18/03/2021];285(2):163-9. Disponible en:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1574-6968.2008.01218.x?sid=nlm%3Apubmed>

42. O' Connor H, MacSharry J, Bueso YF, Lindsay S, Kavanagh EL, Tangney M, *et al.* Resident Bacteria in Breast Cancer Tissue: Pathogenic Agents or Harmless Commensals? *Discov Med.* 2018 Sep [Acceso 21/02/2021];26(142):93-102. Disponible en: <https://www.discoverymedicine.com/Hugh-OConnor/2018/09/resident-bacteria-in-breast-cancer-tissue-pathogenic-agents-or-harmless-commensals/>

### Conflictos de intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

### Contribución de los autores

Conceptualización: Katia Pertuz Yepes, Adriana Sierra Hernández.

Curación de datos: Katia Pertuz Yepes.

Análisis formal: Katia Pertuz Yepes, Jorge Escobar.

Adquisición de fondos: Adriana Sierra Hernández.

Investigación: Katia Pertuz Yepes, Adriana Sierra Hernández.

Metodología: Katia Pertuz Yepes, Adriana Sierra Hernández, Eduardo De Nubbila Lizcano, Israel Díaz.

Administración de proyecto: Katia Pertuz Yepes, Adriana Sierra Hernández.

Recursos: Eduardo De Nubbila Lizcano, Israel Díaz.

Software: Jorge Escobar.

Redacción - borrador original: Katia Pertuz Yepes, Adriana Sierra Hernández.

Redacción - revisión y edición: Katia Pertuz Yepes, Adriana Sierra Hernández.