



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE  
PROGESTERONA Y SUS METABOLITOS  $5\alpha$ -  
DIHIDROPROGESTERONA ( $5\alpha$ -DHP) Y  $3\alpha$ ,  $5\alpha$ -  
TETRAHIDROPROGESTERONA ( $3\alpha$ -THP) EN  
LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE  
GLIOBLASTOMAS HUMANOS MEDIANTE  
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA  
RESOLUCIÓN (HPLC).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

P R E S E N T A:

CARLOS FABRICIO GUADARRAMA RANGEL

DIRECTOR DE TESIS:

DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO



2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Tabla de contenido

1. Resumen.....	7
2. Introducción .....	8
3. Antecedentes .....	9
a) Glioblastomas (GBs) .....	9
b) Hormonas Sexuales .....	11
c) Progesterona (P <sub>4</sub> ) .....	12
d) Metabolitos de la P <sub>4</sub> .....	18
e) Influencia de la progesterona y sus metabolitos en el crecimiento tumoral y el comportamiento de células derivadas.....	20
f) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	20
g) Parámetros importantes en HPLC.....	23
h) Cuantificación de hormonas esteroides por HPLC.....	23
4. Planteamiento del problema .....	24
5. Hipótesis.....	24
6. Objetivos .....	24
a) Generales .....	24
b) Particulares.....	25
7. Metodología .....	25
a) Cultivo celular.....	25
b) Extracción de P <sub>4</sub> , 5 $\alpha$ -DHP y 3 $\alpha$ -THP .....	25
c) Cuantificación de P <sub>4</sub> y sus metabolitos.....	26
8. Resultados .....	27
9. Discusión .....	39
10. Conclusiones.....	41
11. Referencias.....	42

### **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: CAMACHO ARROYO IGNACIO**

**VOCAL: IBARRA RUBIO MARIA ELENA**

**SECRETARIO: GONZALEZ ARENAS ALIESHA ARACELI**

**1er. SUPLENTE: GONZALEZ RODRIGUEZ XOCHIQUETZAL**

**2do. SUPLENTE: VAZQUEZ MARTINEZ EDGAR RICARDO**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 220 DEL EDIFICIO F, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM,  
CIUDAD UNIVERSITARIA, COYOACÁN, Cd. Mx.**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

**DRA. KARINA HERNÁNDEZ ORTEGA**

**SUSTENTANTE:**

---

**CARLOS FABRICIO GUADARRAMA RANGEL**

“Tal vez no hayas tenido un inicio muy feliz,  
pero eso no define quien eres,  
sino el resto de tu historia,  
quien tu decidas ser”

## Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** mi *alma mater*, especialmente a la Facultad de Química que me cobijó bajo el manto de su

enseñanza y sabiduría, le agradezco por mis aprendizajes, mis enseñanzas, las frustraciones, los logros y metas alcanzadas cada paso que di en esta maravillosa facultad.

Al Dr. **Ignacio Camacho Arroyo** por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme un espacio en su grupo de trabajo, por compartirme su conocimiento, por dirigir mi proyecto de tesis, por brindarme su confianza y más que nada su paciencia y tolerancia. A mis **compañeros del laboratorio F-220**, quienes me brindaron su asesoría en temas que ignoraba y su experiencia en técnicas que no dominaba, en especial a mi compañera y asesora **Carmen Janin Zamora Sánchez**.

A la **Unidad de Servicios de Apoyo a la investigación y la industria** de la Facultad de Química por realizar los estudios cuantificación, y especialmente a **Margarita Guzmán Villanueva** técnica académica del área de HPLC, que me brindo todo su apoyo para sacar este proyecto.

A **mis profesores** de todas las materias de la carrera, porque a pesar de todo, desde la perspectiva personal, buenos o malos, a parte del conocimiento transmitido, aprendí varias cosas de ellos que hasta ahora cobran sentido.

## Agradecimientos

A **mis papás y mis hermanos** por apoyarme en todos los aspectos durante la carrera.

A mis amigos de carrera **Lizbeth, Soledad, Diana, Ernesto y David**, por brindarme apoyo y consejos cuando me sentía perdido y por darme ánimos en los momentos que lo necesité.

A mi amigo **David Domínguez** (el pollo), la persona que más me apoyó en tiempos difíciles, quien me regañaba y me centraba cuando veía que quería tirar la toalla, gracias por confiar en mí y por hacerme ver que si podía terminar esta travesía.

### Dedicatoria

Este proyecto, mi carrera, mis metas logradas y todo lo que soy se lo dedico a mis padres: **Onésimo Guadarrama Uribe y Sonia Rangel Esquivel**, pues ellos me han criado y educado con amor y entrega, han realizado sacrificios para que pueda estudiar y terminar una carrera, porque esto es lo mínimo que

puedo hacer para retribuir todo lo que me han dado y es una de las pocas cosas que puedo hacer para retribuir todo el amor que me han brindado.

También quiero dedicar este proyecto a mi sobrino **Santiago Montiel Posada**, para que, en un futuro, si es que pasa por un mal momento académico lea un fragmento del trabajo que realicé y se dé cuenta que, a pesar de las dificultades, las frustraciones y los desafíos, todo puede solucionarse si se pone un poco de dedicación y empeño.

## 1. Resumen

Los gliomas son tumores que tienen características de células gliales y se clasifican con base en sus propiedades histológicas e inmunohistoquímicas en tres grupos:



astrocitomas, oligoastrocitomas y oligodendriogomas, y estos, a su vez, presentan diferentes grados.

Los gliomas de grado IV o glioblastomas (GB) son las neoplasias cerebrales más frecuentes y agresivas, manifestándose principalmente en personas de entre 60 y 80 años y es más común en hombres que en mujeres con una relación de 3:2. Debido a esta relación se pensó en la relevancia que podrían tener las hormonas sexuales en la tumorigénesis y el crecimiento del GB. Una de estas es la progesterona ( $P_4$ ), hormona esteroide que promueve la proliferación, migración e invasión del GB. Se ha reportado que los metabolitos reducidos de la  $P_4$ , la  $5\alpha$ -dihidroprogesterona ( $5\alpha$ -DHP) y la alopregnanolona ( $3\alpha,5\alpha$ -THP), también promueven la progresión de los GBs. Sin embargo, se desconoce si los GBs sintetizan y metabolizan estos esteroides. Por lo tanto, en el presente trabajo se desarrolló un método de extracción líquido-líquido de  $P_4$ , DHP y THP desde líneas celulares derivadas de GB humano, se determinó su presencia y se cuantificó la concentración de estas especies a través de Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a Espectroscopía de Masas (HPLC-MS). Se determinó la presencia y concentraciones la  $P_4$  y de sus metabolitos, las cuales fueron de 0.1022, 0.34242 y 0.2545  $\mu\text{g/ml}$  de  $P_4$ ,  $5\alpha$ -DHP y  $3\alpha,5\alpha$ -THP respectivamente, para la línea celular U251. En conclusión, las células U251 derivadas de GB humanos sintetizan y metabolizan a la  $P_4$ .

## 2. Introducción

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) son la 26ª causa más común de muerte en general y la 12ª causa más común de muerte por cáncer entre la población mundial adulta. Los gliomas representan el 25.4% de los tumores cerebrales y el 80.9% de los tumores malignos del SNC <sup>1,2</sup>. El glioma grado IV o glioblastoma (GB) es el glioma más frecuente, con el 49.1% de todos los casos de gliomas, y es el de mayor malignidad del SNC <sup>3</sup>. Dado que la incidencia de esta enfermedad es mayor en hombres que en mujeres, se ha considerado que las

hormonas sexuales podrían estar involucradas en su desarrollo y progresión. Entre estas hormonas, la progesterona ( $P_4$ ) es una de las principales, y es sintetizada y metabolizada en el SNC generando metabolitos cuya acción prolonga, incrementa o finaliza sus efectos e incluso pueden participar en el crecimiento de tumores cerebrales <sup>4-6 7</sup>. Existen reportes en los que se ha demostrado que los metabolitos  $5\alpha$ -reducidos de la  $P_4$  aumentan el número de células de GB, así como su capacidad proliferativa y migratoria <sup>8,9</sup>.

A pesar de que es conocido que la  $P_4$  y sus metabolitos  $5\alpha$ -DHP y  $3\alpha$ -THP tienen un efecto potenciador en el desarrollo de los GBs en los seres humanos, no existe información sobre la capacidad de las células derivadas de GB humano de sintetizar y/o metabolizar  $P_4$ , por lo tanto, en este trabajo se probó un método de extracción de esta hormona y sus metabolitos, así como la determinación de concentración por un método analítico para conocer sus concentraciones en estas células.

### 3. Antecedentes

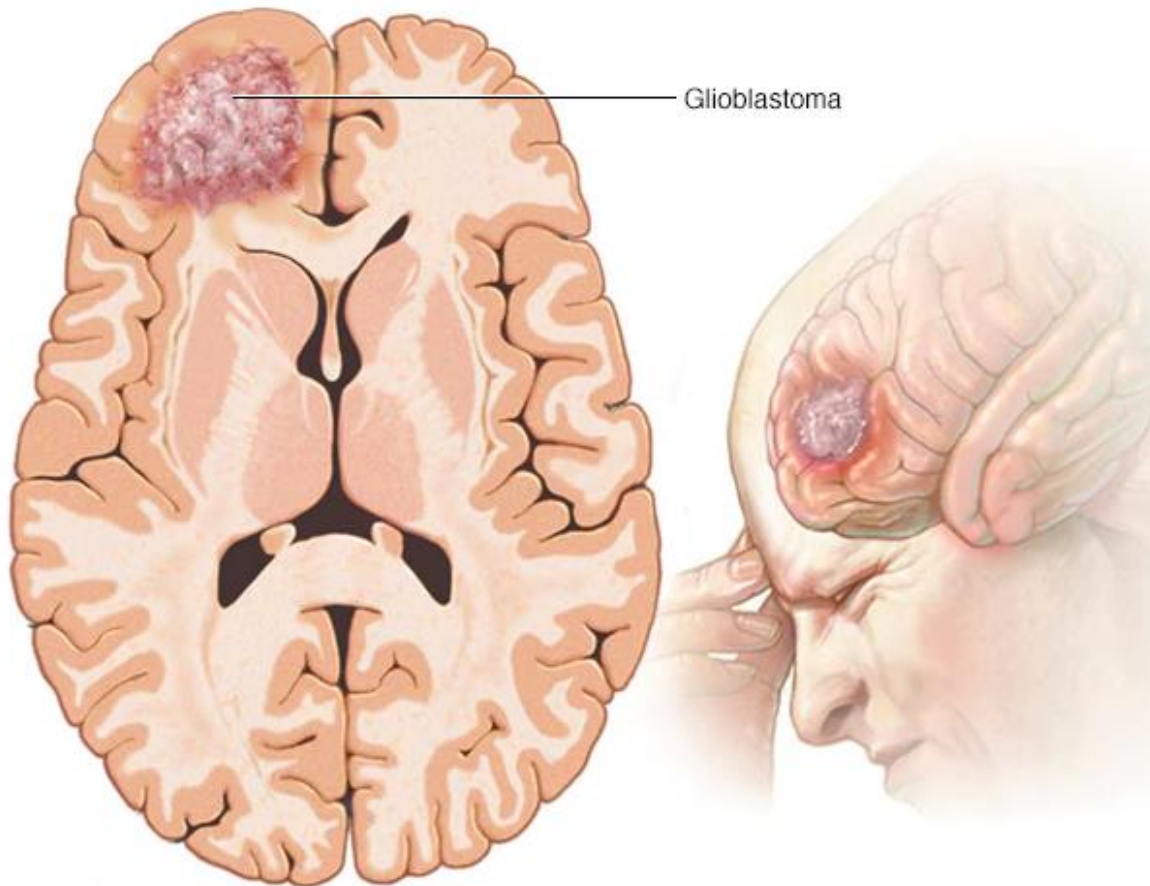
#### a) Glioblastomas (GBs)

Los gliomas son un tipo de tumor del SNC. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los gliomas del I al IV según su grado de malignidad. Los gliomas de grado IV o GBs constituyen el 49.1% de los tumores malignos primarios del SNC y son los más agresivos<sup>3</sup>.

La incidencia de estos tumores es de 3 por cada 100,000 personas y se presenta más comúnmente en personas de entre 75 y 84 años <sup>1,10</sup>, además, los GBs se presentan en una mayor proporción (2:1) en hombres que en mujeres <sup>11,12</sup>.

Los GBs se consideran como los gliomas más agresivos debido a su crecimiento descontrolado, su alta capacidad infiltrante hacia el tejido circundante y resistencia a la apoptosis; además, del aumento de formación de vasos sanguíneos alrededor de la lesión y la presencia de necrosis (Figura 1). Los GBs pueden desarrollarse de

*novo*, es decir, que surgen sin evidencia clínica o histológica de una neoplasia de grado menor, en cuyo caso se les denomina como GB primario. También pueden generarse como GBs secundarios si se desarrollan de neoplasias de grados menores, como los astrocitomas difusos (grado II) o astrocitomas anaplásicos (grado III) <sup>13</sup>.



**Figura 1.**– Representación gráfica del glioblastoma en el cerebro, modificado de *Fundación Mayo para la educación e investigación médicas (2011)*.

Las principales alteraciones genéticas de los GBs son la ganancia de una copia del cromosoma 7 y la pérdida de una copia del cromosoma 10, la amplificación del gen del receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mutación del promotor TRET<sup>14</sup>, metilación del promotor la O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT), pérdida de la p16, la amplificación del gen de la cíclica CDK4 y la metilación del promotor RB1. <sup>10,13,15–17</sup>.

Se ha sugerido que los GBs pueden derivarse de un pequeño conjunto de células troncales y progenitoras neurales adultas que se encuentran en la zona subventricular, la sustancia blanca subcortical y la circunvolución dentada del hipocampo <sup>18-20</sup>.

Los GBs se clasifican en 3 subtipos: proneural, clásico y mesenquimal con base en el perfil de expresión génica. El subtipo proneural está caracterizado por la activación de la vía del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGR, por sus siglas en inglés); el subtipo clásico presenta ganancia del cromosoma 7, amplificación de EGFR, pérdida del cromosoma 10 y delección de CDKN2A, y el subtipo mesenquimal se caracteriza por la pérdida de NF1, además de la sobreexpresión de marcadores mesenquimales, como CHI3L1 y MET <sup>15</sup>. Este último es el más agresivo.

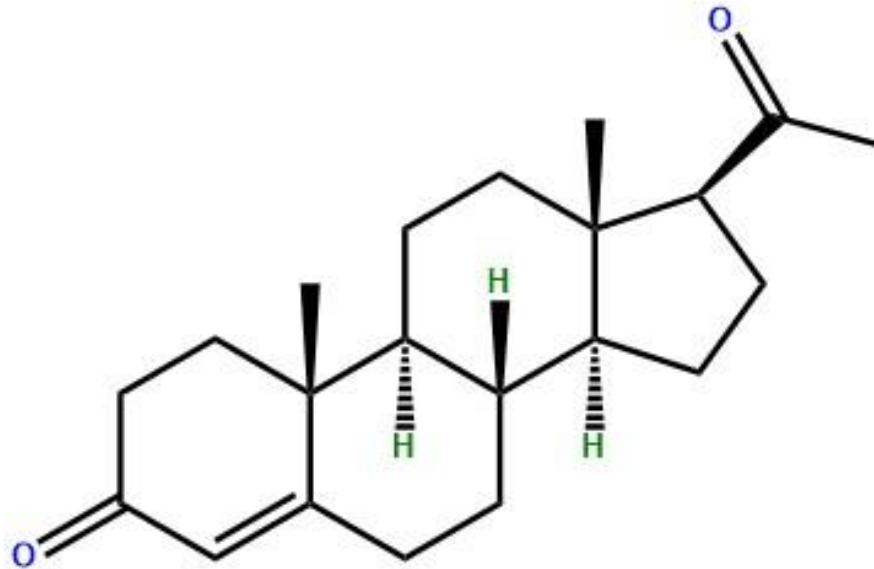
El tratamiento más frecuente para esta enfermedad es la resección quirúrgica máxima posible de la masa tumoral, junto con una radioterapia de 50 a 60 Gy y quimioterapia con un agente alquilante como la Temozolomida <sup>21</sup>. La media de supervivencia con este tratamiento es de 14.8 meses<sup>22</sup>. El crecimiento de los GBs depende de varios factores, entre ellos, las hormonas sexuales.

### **b) Hormonas Sexuales**

Las hormonas sexuales son moléculas lipídicas sintetizadas en las gónadas, la placenta, la glándula adrenal y el SNC <sup>23</sup>, que participan en la conducta sexual, el mantenimiento del embarazo, el desarrollo muscular y esquelético, la maduración de los órganos reproductores de los mamíferos, así como del dimorfismo sexual <sup>24,25</sup>. Son compuestos químicos policíclicos derivados del colesterol <sup>26</sup> cuya estructura básica es la del ciclopentanoperhidrofenantreno. Estos son sintetizados a través de varias vías enzimáticas<sup>27,28</sup>. Los oligodendrocitos, astrocitos y neuronas, células componentes del SNC expresan enzimas necesarias para sintetizar hormonas sexuales a partir del colesterol y metabolizarlos para generar moléculas neuromoduladoras <sup>29-31</sup>.

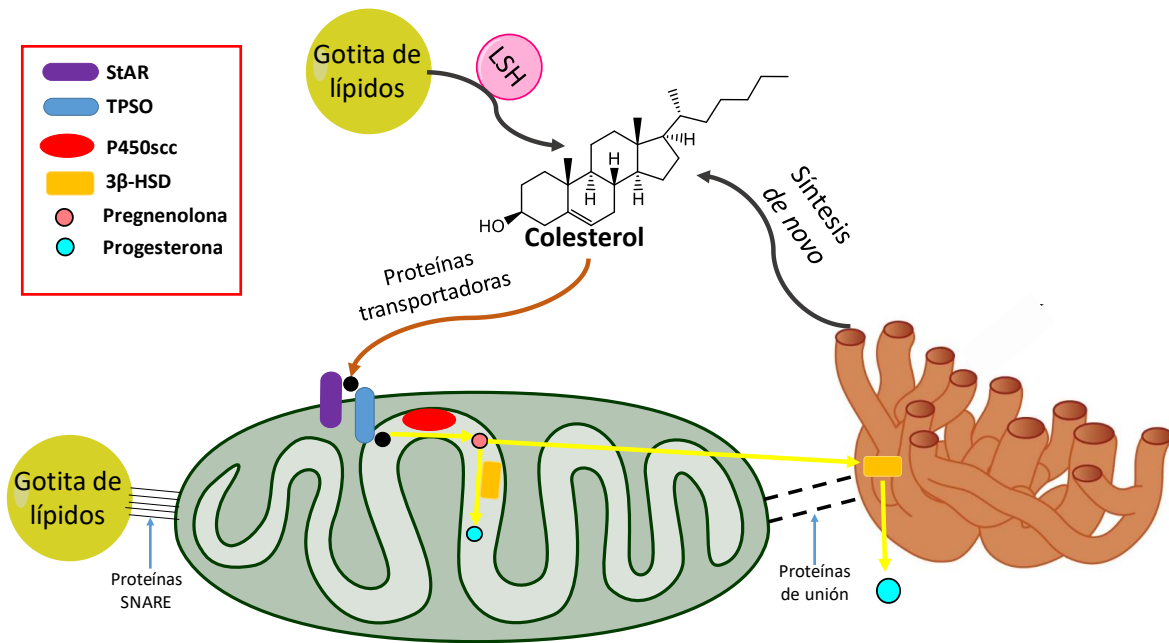


La progesterona es una hormona esteroide de 21 carbonos con un núcleo pregnano que contiene dos grupos cetonas, uno en el carbono 3 y otro en el carbono 20, y que cuenta con una insaturación entre los carbonos 4 y 5 <sup>34,35</sup> (Figura 3).



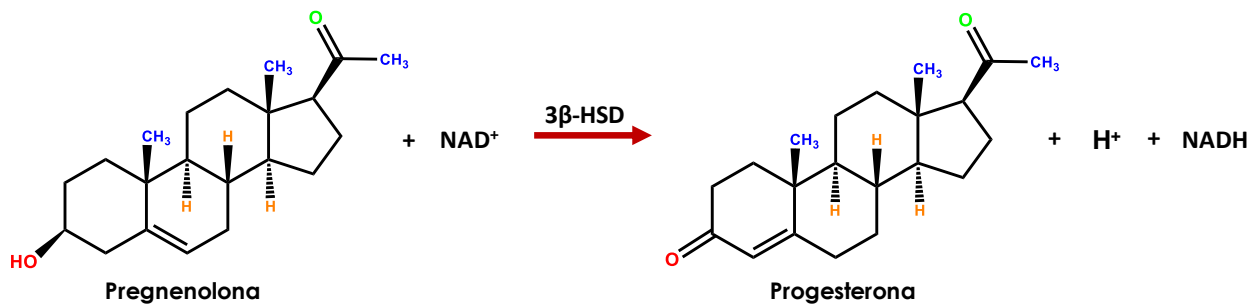
**Figura 3.-** Estructura química de la Progesterona(P<sub>4</sub>).

La síntesis de la P<sub>4</sub> es un proceso altamente compartimentalizado (Figura 4), este comienza por la translocación del colesterol presente en el citosol, el cual puede ser liberado desde gotitas de lípidos como ésteres de colesterol desesterificado por lipasa sensible a hormonas (LSH) o sintetizado *de novo* por el retículo endoplasmático liso<sup>36</sup>, hacia la membrana interna de la mitocondria mediada por la proteína reguladora de esteroidogénesis aguda (StAR) y la proteína traslocadora de 18 kDa (TSPO) <sup>37</sup>. Una vez dentro de la membrana interna de la mitocondria, el citocromo P450<sub>scc</sub> hidroxila los carbonos 20 y 22 de la cadena lateral del colesterol, seguido de la ruptura del enlace entre estos mismos carbonos, formando agua, 4metil-pental y pregnenolona<sup>38</sup>.



**Figura 4.-** Síntesis de progesterona (P4) a partir de colesterol. En células esteroidogénicas el colesterol puede obtenerse por la desesterificación de ésteres de colesterol por la lipasa sensible a hormona (HSL) o ser sintetizado *de novo* en el retículo endoplasmático liso. El colesterol puede llegar a la membrana mitocondrial externa (MME) a través de uno o más de al menos tres posibles mecanismos. El primero, a través de dominios del retículo endoplasmático llamados "membrana asociada a mitocondrias" (MAM) que pueden asociarse con la MME a través de "proteínas de unión" que permiten el flujo no vesicular de colesterol a la MME. El segundo, a través de proteínas transportadoras de unión al colesterol, como las que pertenecen a la familia Star D4, D5, D6, que transportan colesterol a la MME. El tercero, las gotitas de lípidos pueden asociarse con la MME a través de proteínas receptoras de proteínas de fijación soluble de factor sensible a la N-etilmaleimida (SNARE), lo que permite el transporte vesicular de colesterol al MME. Independientemente de cómo el colesterol llegue al MME, la proteína transportadora de 18kDaltones lo transporta de la MME a la matriz mitocondrial donde se convierte en pregnenolona por la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (P450scc). Después la pregnenolona es convertida en progesterona en la matriz mitocondrial o en el retículo endoplasmático liso por la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $^5\Delta$ - $^4\Delta$  isomerasa.

La pregnenolona puede difundirse hacia el citoplasma y ser metabolizada por la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $^5\Delta$ - $^4\Delta$  isomerasa (3β-HSD) (Figura 5), la cual, está presente en la matriz mitocondrial y en la membrana del retículo endoplasmático liso. La 3β-HSD cataliza dos reacciones; la primera es la deshidrogenación del grupo alcohol del carbono 3 y la segunda es la isomerización del enlace doble entre los carbonos 5 y 6 a los carbonos 4 y 5 del núcleo pregnano, formando así la progesterona <sup>39</sup>.



**Figura 5.-** Transformación catalítica de pregnenolona a progesterona (P<sub>4</sub>) a través de la 3β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa.

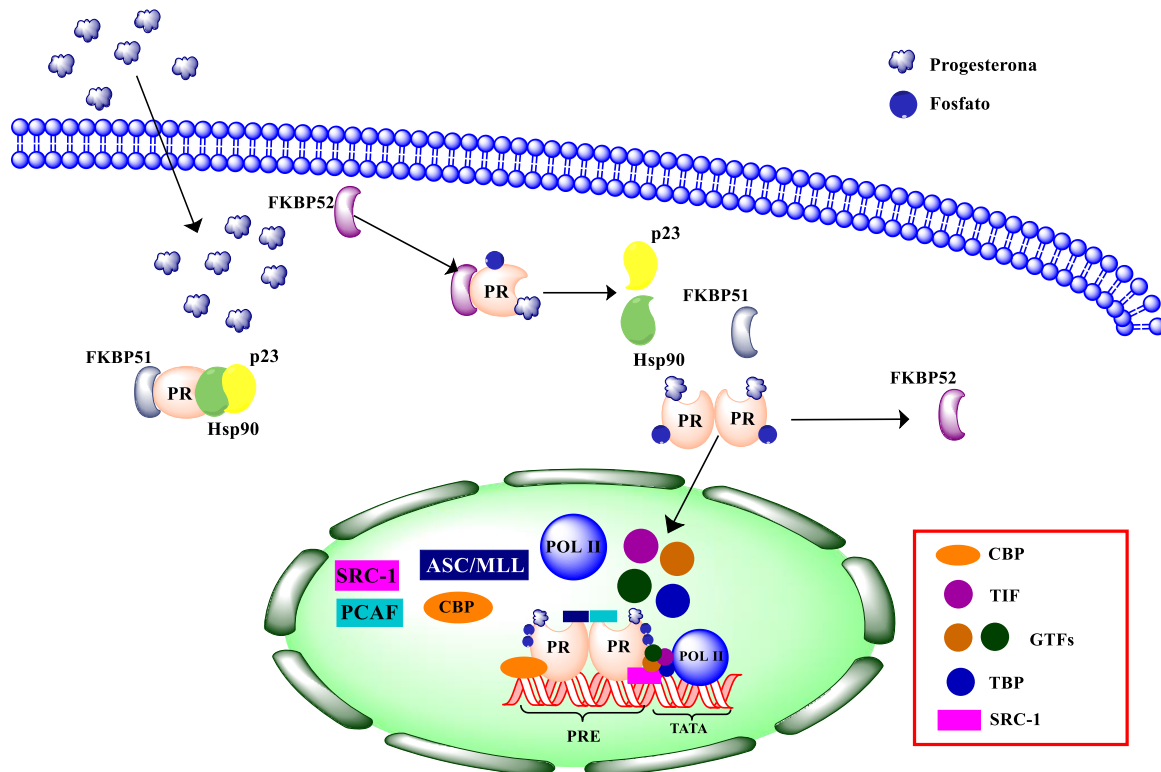
La P<sub>4</sub> tiene varias funciones en el cuerpo humano, las más importantes en el sexo femenino son la regulación de los ciclos reproductivos, el mantenimiento del embarazo, el despliegue de la conducta sexual y la diferenciación cerebral, entre otros; además, se ha demostrado que la P<sub>4</sub> tiene efectos neuroprotectores contra algunas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o también contra la toxicidad inducida por el FeSO<sub>4</sub> el péptido β-amiloide<sup>40</sup>. La P<sub>4</sub> regula procesos fisiológicos en neuronas y células gliales. Entre ellos la excitabilidad y la plasticidad neuronal<sup>7</sup>. Una función importante de la P<sub>4</sub> es la promoción de la mielinización por los oligodendrocitos y las células de Schwann<sup>41,42</sup>. Dos propiedades principales de los tratamientos con P<sub>4</sub> son la disminución de la inflamación y la angiogénesis. El tratamiento con P<sub>4</sub> reduce la expresión de marcadores inflamatorios como la interleucina 1-β (IL-1β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF-α), y reduce el riesgo de complicaciones posteriores después de una hemorragia intracraneal<sup>43</sup>.

En general, la P<sub>4</sub> ejerce su efecto en las células blanco por medio de dos mecanismos, el mecanismo clásico y el mecanismo no clásico.

En el mecanismo clásico, la P<sub>4</sub> se une a un receptor nuclear específico llamado receptor a progesterona (PR). Este receptor es un factor de transcripción activado por ligando que en ausencia de esta hormona se encuentra en una forma inactiva en el citoplasma asociado con proteínas chaperonas, como la proteína de choque térmico 90 (Hsp90, por sus siglas en inglés). Una vez que la P<sub>4</sub> interactúa con el PR se induce un cambio conformacional en el mismo, lo cual promueve su fosforilación



por MAPK, la disociación del complejo de chaperonas, la dimerización del receptor y su translocación al núcleo. Ya en el núcleo, el receptor activo se une a elementos de respuesta a progesterona (PREs, por sus siglas en inglés) específicos ubicados en las regiones reguladoras de genes blanco. La transcripción inicia mediante el reclutamiento de coactivadores y complejos remodeladores de la cromatina que facilitan el acoplamiento de la maquinaria de transcripción basal (Figura 5).



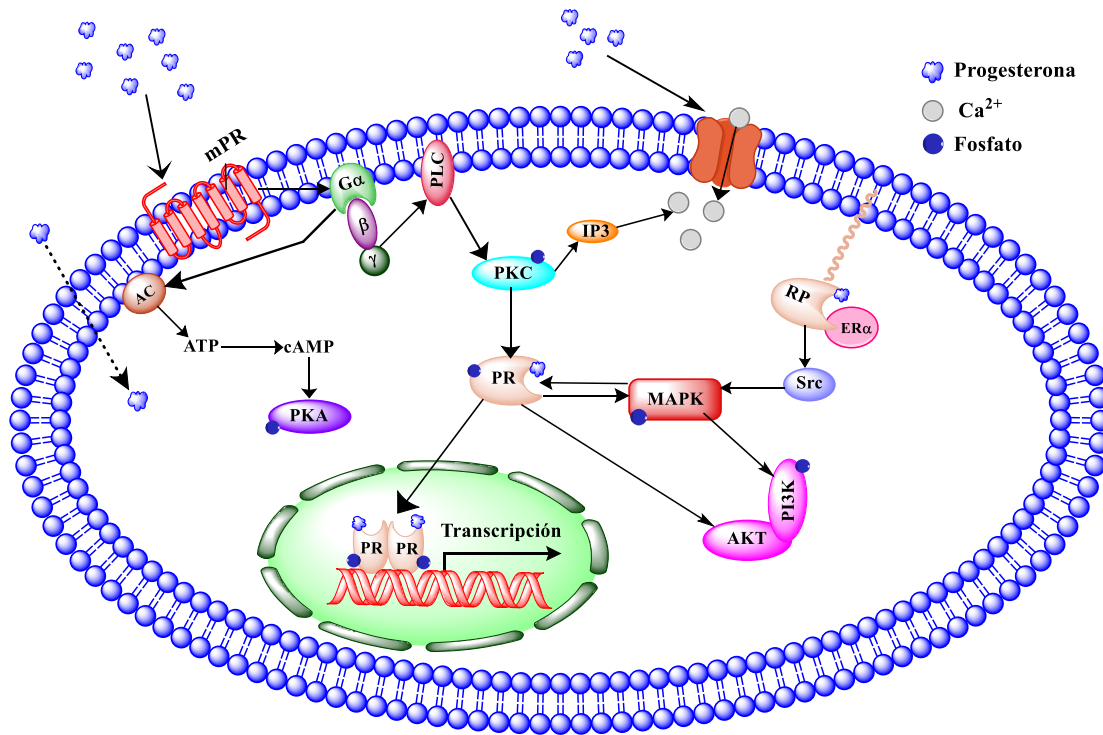
**Figura 6.-** Mecanismo de acción clásico de la P<sub>4</sub>. En ausencia de P<sub>4</sub> el PR se encuentra unido a la proteína chaperona Hsp90, y a las proteínas cochaperonas FKBP51 y p23. Al entrar a la célula e interactuar con el PR la P<sub>4</sub> induce un cambio conformacional que promueve la fosforilación en este receptor, se disocia del complejo de proteínas que lo acompañan, y se asocia con la cochaperona FKBP52 que intercede en la dimerización del receptor y su traslocación al núcleo. Así, el PR activo se une a Elementos de Respuesta a Progesterona (PREs). La transcripción de genes inducida por PR requiere el reclutamiento de coactivadores específicos como SRC-1 y CBP, así como el factor asociado a p300/CBP (PCAF) y el complejo ASC/MLL que promueven la acetilación de histonas H3. El complejo coregulador del PR interactúa con complejos remodeladores de cromatina que mejora la fijación de la maquinaria de transcripción basal constituida por el Factor de inicio de transcripción (TIF), el Factor de transcripción general (GTF), la Proteína de unión a TATA (TBP) y la RNA polimeraza II (Pol II) para activar la transcripción de genes.

Los mecanismos de acción no clásicos de la P<sub>4</sub> se llevan a cabo en tiempos muy cortos tras la exposición hormonal (Figura 6). Esta señalización rápida se inicia con la interacción de la hormona a sus receptores membranales específicos cuya

activación desencadenará vías de señalización como: cascadas de segundos mensajeros, activación de canales iónicos, o fosforilación de diferentes enzimas<sup>6</sup>.

La activación de las vías de señalización puede ocurrir mediante una fracción citoplásmica del PR que se encuentra adherido a la membrana plasmática, la translocación del PR a la membrana plasmática se produce mediante el anclaje de la proteína de choque térmico 27 (Hsp27) y la posterior palmitoilación de los residuos de aminoácidos ubicados en el dominio de unión al ligando<sup>44</sup>. El receptor tiene un motivo rico en prolina dentro del dominio N-terminal, este motivo permite que el RP interactúe con los dominios homologos a Scr 3 (SH3) de la tirosina cinasa c-Src, activando así la ruta Src/ MAPK<sup>44</sup>. La activación de MAPK inducida por P4 puede conducir cambios en el ciclo celular, como lo demuestra la regulación positiva de ciclina D1 y CDK2<sup>45,46</sup>. Además, también se ha informado que el PR induce la señalización de EGFR a través de la activación de proteínas de señalización como Jak1/2 y Stat3<sup>47</sup>. Algunas de estas cascadas de señalización inducidas por P4 también pueden conducir a la activación transcripcional del PR sobre genes blanco como EGFR y p21. Otras vías activadas por el PR son la PI3K/Akt<sup>48</sup>, la inhibición de la GTPasa RhoA a través de la activación de c-Src, y la activación y translocación nuclear de ErbB-2<sup>49,50</sup>. Además de los efectos rápidos mediados por el PR, existe una familia de receptores progesterona P4 de membrana (mPR), denominados PAQR (receptores de progestina y adiponectina Q), así como los componentes de membrana del receptor de progesterona 1 y 2 (PGRMC1 / 2) que tienen diferentes propiedades bioquímicas y farmacológicas<sup>51</sup>. Se han identificado cinco subtipos de mPR (mPR $\alpha$  a mPR $\epsilon$ ), caracterizados por siete dominios transmembranales, y expresados en diferentes tejidos<sup>52,53</sup>. Los mPR modifican los niveles de AMPc intracelular, activando proteínas G<sup>54</sup>. De hecho, la activación de G-alfa-i por los mPR regula la activación de las vías de las MAPKs y las PKC al disminuir los niveles de AMPc<sup>55,56</sup>. Los mPRs también pueden estimular la vía PI3K/Akt, activar los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, e interactuar con la isoforma B del PR para inducir la transcripción de genes<sup>57-59</sup>. Otro efecto rápido de la P4 ocurre a través de las proteínas PGRMC1/2. Se ha informado que PGRMC1 tiene acciones antiapoptóticas en las células de la granulosa/lúteas, para interactuar y regular las

enzimas del citocromo P450 y para regular la síntesis de colesterol y esteroides. Se sabe mucho menos sobre la función de PGRMC2, pero se ha descrito que regula la entrada a la fase G<sub>1</sub>/S del ciclo celular en las células de la granulosa<sup>60-62</sup>.



**Figura 7.-**Mecanismos no clásicos de la P<sub>4</sub>. Las acciones de la P<sub>4</sub> pueden ocurrir vía un mecanismo dependiente o independiente de ligando. El mecanismo dependiente de ligando incluye la fracción de un RP citoplasmático anclado a la membrana por medio de residuos palmitoilados. En presencia de P<sub>4</sub> el RP anclado a la membrana interactúa con el Receptor a Estrógenos alfa (ERα) y activa la tirosina cinasa Src, la cual, inmediatamente activa la vía de señalización de las Proteína Cinasa Activada por Mitógenos (MAPK). Adicionalmente, El RP puede activar otras vías de señalización de manera indirecta, como la vía de señalización PI3K/AKT, entre otras. Otro mecanismo dependiente de ligando se lleva a cabo a través de la activación de Receptores a Progesterona Membranales (mRPs), los cuales son receptores con 7 dominios transmembranales que están acoplados a proteínas G. Una vez activa, la proteína G activa la Adenilato Ciclasa (AC) y la Fosfolipasa C (PLC) las cuales producen segundos mensajeros como el Adenosín Monofosfato cíclico (cAMP) y diacilglicerol más inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), respectivamente. Estos segundos mensajeros a su vez pueden modular las vías de señalización de la Proteína Cinasa dependiente de cAMP (PKA), PKC y MAPK. En el mecanismo de acción independiente de ligando, el RP puede ser activado a través de modificaciones postraduccionales como la fosforilación inducida por MAPKs y Proteínas Cinasas dependientes de Ca<sup>2+</sup> (PKCs).

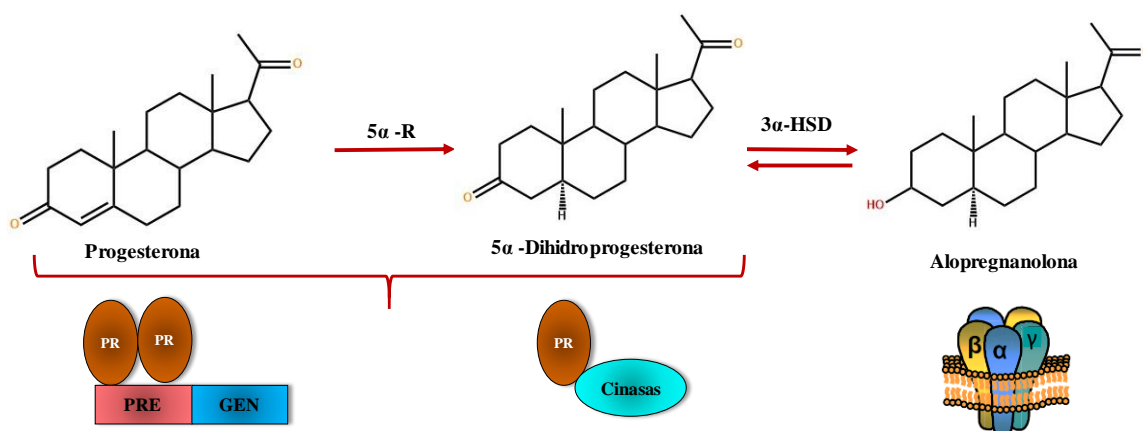
#### d) Metabolitos de la P4

No solo la P4 ejerce efectos sobre las células del órgano blanco, sino también sus metabolitos reducidos regulan diversos procesos celulares; Por ejemplo, la 5α-dihidroprogesterona (5α-DHP) se une al PR<sup>63</sup> y modifica la expresión de genes blanco. Otro metabolito 5α-reducido, la 3α,5α-Tetrahidroprogesterona (3α-THP), también llamada alopregnanolona, ejerce varios efectos fisiológicos; de hecho, la

3 $\alpha$ -THP es un importante modulador alostérico del receptor tipo A del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés) (GABA<sub>A</sub>) y también regula la liberación de GABA y glutamato <sup>64</sup>.

Al igual que la P<sub>4</sub>, estos metabolitos son sintetizados por una vía enzimática que incluye dos reacciones de  $\alpha$ -reducción. La primera reducción la realiza la enzima 5 $\alpha$ -Reductasa (5 $\alpha$ R), localizada en la membrana del retículo endoplásmico rugoso<sup>65</sup> (figura 8). Esta enzima se encarga de añadir un átomo de hidrógeno en la posición  $\alpha$  del carbono 5, reduciendo el enlace doble localizado entre los carbonos 4 y 5 del núcleo pregnano <sup>66</sup>, generando como producto la 5 $\alpha$ -DHP. La segunda reacción de reducción es catalizada por la enzima 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\alpha$ -HSD), la cual metaboliza la 5 $\alpha$ -DHP reduciendo el grupo cetona del carbono 3 del núcleo pregnano a alcohol, dando como producto la 3 $\alpha$ -THP. Mientras que la 5 $\alpha$ -reducción de la P<sub>4</sub> es una reacción irreversible, la alopregnanolona se puede convertir de nuevo en 5 $\alpha$ -DHP por medio de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta asociadas a la membrana dependientes de NAD<sup>+</sup>, que actúan como 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide oxidasas <sup>67</sup>.

La P<sub>4</sub> y sus metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos, la 5 $\alpha$ -DHP y la 3 $\alpha$ -THP, inducen la proliferación y migración de líneas celulares de cáncer de mama y ovario <sup>66,68-72</sup>.



**Figura 8.-** Reducción de la P<sub>4</sub> a 5 $\alpha$ -DHP por medio de la 5 $\alpha$ -reductasa (5 $\alpha$ R). La P<sub>4</sub> y la 5 $\alpha$ -DHP se unen al PR intracelular; la 5 $\alpha$ -DHP puede ser metabolizada por la 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\alpha$ -HSD) reduciéndola a alopregnanolona (3 $\alpha$ -THP), que es un importante modulador alostérico.

## e) Influencia de la progesterona y sus metabolitos en el crecimiento tumoral y el comportamiento de células derivadas.

En modelos *in vitro*, se ha visto que una concentración de 10 nM de P<sub>4</sub> induce un aumento en la proliferación, migración e invasión en líneas celulares derivadas de GBs humanos, y una cantidad de 1 mg genera un incremento en el área e infiltración tumoral en un modelo *in vivo*<sup>73</sup>. Se ha reportado también que la 5 $\alpha$ -DHP a diferentes concentraciones aumenta el número y la migración de células U87 y U251 derivadas de GB humano<sup>9</sup>. Así mismo, la 3 $\alpha$ -THP promueve la proliferación en células U87 derivadas de un GB humano, además de que induce la expresión de distintos genes relacionados con la progresión del cáncer como EGFR, VEGF, ciclina D1 y TGF $\beta$ 1<sup>8</sup>.

## f) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía agrupa un conjunto diverso de métodos de separación, identificación y cuantificación de componentes similares en una matriz compleja. Muchas de estas separaciones son imposibles por otros métodos<sup>74</sup>. Los métodos cromatográficos consisten en la dilución de la muestra a analizar en una *fase móvil*, la cual puede ser un gas, líquido o fluido supercrítico. Ésta se hace pasar a través de una *fase estacionaria*, insoluble en la fase móvil o en la mezcla de análisis y que está adherida a una columna o a una superficie sólida<sup>75</sup>.

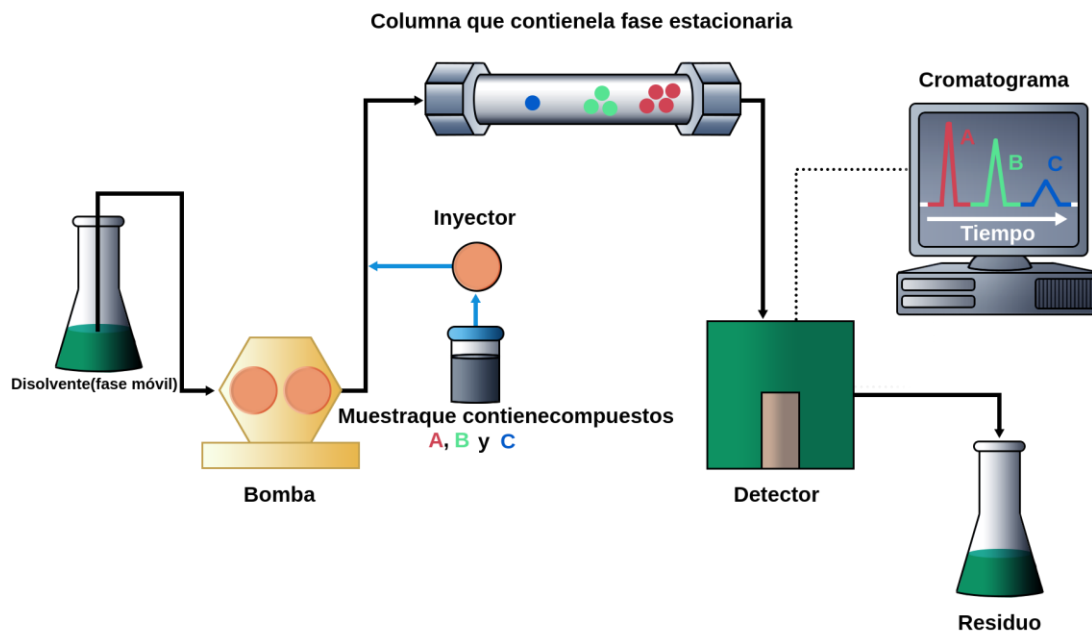
Todas las formas de cromatografía de líquidos son procesos de migración diferencial, donde los componentes de la muestra son selectivamente retenidos por una fase estacionaria y eluidos secuencialmente mediante el cambio de polaridad de la fase móvil.

Es muy importante elegir las fases de manera correcta para que los componentes de la muestra se separen y sean diferenciables en los resultados obtenidos. La disparidad de la retención de los analitos en la muestra analizada arroja como resultado señales llamadas “picos” o “bandas”. Estas señales son plasmadas en un

gráfico denominado *cromatograma*, y en función de su posición e intensidad, estas señales pueden ser analizadas cualitativa y/o cuantitativamente <sup>76</sup>.

En la cromatografía líquida, la separación de los componentes ocurre cuando, bajo condiciones óptimas, cada componente de la mezcla entra en contacto de manera diferente con las dos fases de forma distinta respecto a los demás componentes de la mezcla.

La *cromatografía de líquidos de alta resolución* (HPLC, por sus siglas en inglés) es la técnica cromatográfica en la que la fase móvil es bombeada mecánicamente a través de una columna que contiene la fase estacionaria. Por lo tanto, un sistema de HPLC consiste en un inyector, una bomba, un depósito para la fase móvil, una columna y un detector <sup>77</sup>. Todo este equipo está incorporado a un sistema de visualización en el cual se pueden observar los resultados de forma gráfica (Cromatograma) (figura 9). La función de cada componente es:



**Figura 9.-** Diafragma de un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Tomado de *Labster Theory.* (s/f). *Labster.com.*  
[https://theory.labster.com/high\\_performance\\_liquid\\_chromatography-es/](https://theory.labster.com/high_performance_liquid_chromatography-es/)

**Depósito de fase móvil:** Contiene los disolventes de la fase móvil. En HPLC, la fase móvil es una solución que se compone de líquidos polares y no polares. Estos líquidos se mezclan dentro del equipo en diferentes proporciones dependiendo de las propiedades del compuesto a analizar<sup>78</sup>.

**Bomba:** Succiona la fase móvil del depósito y la hace pasar a presión por la columna. El sistema de bombeo es riguroso y para un buen proceso requiere de características específicas como la generación de presiones por encima de 400 kg/cm<sup>2</sup>, un flujo libre de pulsaciones, un intervalo de caudales de 0.1 a 10 mL/min, control, reproducibilidad de caudal y componentes resistentes a la corrosión<sup>79</sup>. Para su buen funcionamiento es necesario que las fases móviles estén libres de gases disueltos o partículas en suspensión. Para esto se suelen utilizar desgasificadores que permiten arrastrar los gases disueltos fuera de la solución mediante burbujas finas de un gas inerte de baja solubilidad<sup>78</sup>.

**Inyector:** Es un dispositivo hermético, capaz de introducir la muestra a la fase móvil antes de entrar a la columna sin pérdida de presión que pueda modificar el flujo proporcionado por la bomba<sup>78</sup>.

**Columna:** Cilindro normalmente metálico con una longitud de entre 50 y 300 mm que contiene en su interior la fase estacionaria que está compuesta de sílica tratada con RMe<sub>2</sub>SiCl<sup>80</sup> con tamaño de partícula de 3 a 10 µm, o materiales porosos, en su mayoría polímeros, con determinados tamaños de poro para la separación de analitos de interés. La temperatura de la fase móvil y la columna deben ser constantes durante todo el proceso<sup>81</sup>.

**Detector:** Está posicionado al final de la columna, se encarga de distinguir los analitos a medida que salen de la columna cromatográfica. Existen varios tipos de detectores que utilizan diferentes propiedades para poder identificar a los analitos, como los detectores ópticos que detectan la interacción de una radiación (infrarroja, luz visible, fluorescencia, ultravioleta) con los analitos; los detectores eléctricos que

miden alguna propiedad eléctrica; y los detectores específicos y de detección híbrida<sup>82</sup>.

**Dispositivo recopilador de datos o integrador:** Se encarga de dos tareas, plasmar la señal del detector en un cromatograma y controlar los módulos del equipo<sup>77</sup>.

### g) Parámetros importantes en HPLC

### h) Cuantificación de hormonas esteroideas por HPLC

La cromatografía líquida, y en especial la de alta resolución, se caracteriza por la selectividad que se logra en la columna y la sensibilidad mejorada en el paso de detección. El tipo de detector que se utiliza debe seleccionarse de acuerdo a las concentraciones de analito que se a detectar en las muestras que se analizarán. En general, para niveles de concentración de analito en el rango micromolar ( $10^{-6}$  mol/L) en la muestra, un detector de infrarrojo (IR) podría ser adecuado. Para una detección con mayor sensibilidad, es decir, de compuestos en niveles nanomolares ( $10^{-9}$  mol/L) a 10 picomol ( $10^{-12}$  mol/L), los detectores UV o visibles, de fluorescencia y electroquímicos serían adecuados. Para niveles por debajo de 10 picomol, se pueden utilizar detectores de fluorescencia láser, quimioluminiscencia (CL) y electroquímicos<sup>84</sup>.

Por otro lado, la cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS /MS) se ha convertido “recientemente” en un método ampliamente utilizado para determinar la concentración de P4 en matrices biológicas. Se describió por primera vez utilizando termonebulización como fuente de iones a principios de la década de 1980<sup>85</sup>. La técnica se volvió adecuada para el análisis de esteroides conjugados y no conjugados, pero la fuente de iones finalmente sería reemplazada por el desarrollo de la espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI)<sup>86</sup>. La ionización química a presión atmosférica (APCI) evolucionó como una técnica complementaria a la ionización por electropulverización (ESI) y es relevante en la



espectrometría de masas de esteroides debido a su potencial reducido de efectos de matriz frente a ESI<sup>87</sup>. Se han reportado en la literatura los niveles de P<sub>4</sub> en diversas muestras biológicas como suero (1.04–19.95 µg/L)<sup>88</sup>, saliva (14.0–48.6 pg/mL)<sup>89</sup>, orina (1.5 ng/mL)<sup>90</sup> y algunos tejidos como de endometrio (181– 201pM) por medio de bioanálisis con HPLC-MS.

## 4. Planteamiento del problema

Las células gliales sintetizan y metabolizan hormonas esteroides. Se ha demostrado que la P<sub>4</sub> y sus metabolitos 5α-DHP y 3α-THP participan en la progresión de los GBs. Dado que ésta es una neoplasia derivada de células gliales, y que no existe información sobre el metabolismo de la P<sub>4</sub> en los GBs, el presente trabajo se realizó para determinar y cuantificar la presencia de P<sub>4</sub>, 5α-DHP y 3α-THP en células derivadas de GB humano.

## 5. Hipótesis

Si las células derivadas de GB humano tienen la capacidad de sintetizar y metabolizar a la P<sub>4</sub> en sus metabolitos 5α-reducidos, entonces se podrán extraer y determinar su concentración a través de la técnica analítica de HPLC.

## 6. Objetivos

### a) Generales

- Desarrollar un método de extracción líquido-líquido para extraer P<sub>4</sub>, 5α-DHP y 3α,5α-THP.
- Determinar la concentración de P<sub>4</sub> y sus metabolitos, 5α-DHP y 3α,5α-THP en líneas celulares derivadas de GB humanos mediante el método de HPLC-MS.

## b) Particulares

- Estandarizar el método de extracción y cuantificación de P<sub>4</sub>, 5 $\alpha$ -DHP y 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP por extracción líquido-líquido y cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectroscopía de masas.
- Realizar cultivos de las líneas celulares U251 y U87 derivadas de GBs humanos.
- Extraer P<sub>4</sub>, 5 $\alpha$ -DHP y 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP de las líneas celulares U87 y U251 derivadas de GBs Humano.
- Determinar la concentración de P<sub>4</sub>, 5 $\alpha$ -DHP y 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP de las líneas celulares U87 y U251 derivadas de GBs Humano.

## 7. Metodología

### a) Cultivo celular

Se realizaron cultivos de las líneas celulares U251 y U87, obtenidas de *American Type Culture Collection* ((ATCC), Manassas, Virginia, EUA), derivadas de glioblastomas humanos. Se cultivaron en cajas Petri de 10 cm de diámetro en Medio Eagle Modificado Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés, Cat. N° L0107-500) con rojo de fenol, suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB, Cat. N° S1820-500), 1 mM de piruvato de sodio (Cta. N° L0642-100), 2 mM de glutamina (Cat. N° X0551-100), aminoácidos no esenciales 0.1 mM (Cat. N° X0557-100) y antibiótico-antimicótico 1mM (Cat. N° 15240-062) a 37 °C en una atmósfera humidificada y con 5% de CO<sub>2</sub>, hasta que se observó una confluencia de entre 85 y 100%.

### b) Extracción de P<sub>4</sub>, 5 $\alpha$ -DHP y 3 $\alpha$ -THP

Para la obtención de la P<sub>4</sub> y sus metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos, se retiró el medio de cultivo de las cajas Petri y se lavaron las células con buffer salino de fosfatos (PBS). Se retiró el PBS y se añadió PBS-EDTA para despegar las células de la caja Petri. Las células ya despegadas se transfirieron a un tubo tipo falcon y se centrifugaron a 4500 revoluciones por minuto (r.p.m.) de 3 a 4 minutos, se retiró el PBS-EDTA y

se resuspendieron en PBS, de 2 a 3 mL. Se cuantificó el número de células, para lo cual, se tomaron 10  $\mu$ L de la solución y se adicionaron en 10  $\mu$ L de azul de tripan, se colocaron 10  $\mu$ L de la mezcla a una cámara de Neubauer y se colocaron en contador celular (Countess™ II FL Automated Cell COUNTER, Cat. N° AMQAF1000) para determinar el número de células. Se necesitaron de aproximadamente  $10 \times 10^6$  células.

Para realizar la lisis celular por sonicación, las células se sumergieron en un baño de hielo, se colocaron en un sonicador Ultrasonic Processor (Modelo GEX130, N° serie 55581 T) y se sonicaron a 10 KHz en pulsos de 10s por 1 minuto y medio en un baño de hielo. Después de este proceso, se trasvasaron 500  $\mu$ L de muestra a tubos tipo Eppendorf.

Para la extracción líquido-líquido se probó la eficiencia de extracción del dietil éter, el cloroformo y el acetato de etilo, después de los análisis por HPLC se identificó que el acetato de etilo es el disolvente capaz de extraer a la P<sub>4</sub>, la 5 $\alpha$ -DHP y la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP. Se añadieron 500  $\mu$ L de acetato de etilo (AcOEt, Cat. N°) a cada tubo con muestra y se agitaron en vortex a máxima intensidad por al menos 20s. Las muestras se llevaron a refrigeración y se dejaron reposar toda la noche, al día siguiente se centrifugaron en una centrifuga Eppendorf 5804 R a 20800 g por 15 minutos a 4 °C, se prosiguió a separar la fase orgánica trasvasándola a tubos Eppendorf nuevos. La fase acuosa se volvió a extraer con 300  $\mu$ L de AcOEt, se agitó en vortex por al menos 15s, se dejó reposar de 5 a 10 minutos y se volvieron a centrifugar, ahora a 20800 g por 8 minutos a 4 °C. Se juntaron las fases orgánicas de ambas centrifugaciones y se desecharon las fases acuosas. Después, se evaporó el disolvente en un concentrador Eppendorf 5301 de 10 a 15 minutos de 30 a 45 °C hasta llegar a sequedad y el precipitado se resuspendió en 500  $\mu$ L de etanol.

### c) Cuantificación de P<sub>4</sub> y sus metabolitos

Para determinar la concentración de la P<sub>4</sub> y sus metabolitos en los cultivos, primero se realizó una curva de calibración con soluciones estándar de la P<sub>4</sub>, la 5 $\alpha$ -DHP y la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP a concentraciones conocidas para realizar un gráfico en el cual se pudieran extrapolar o interpolar las concentraciones de las muestras. Con base en

las concentraciones presentes en las diferentes muestras biológicas de estas biomoléculas consultadas en la literatura, se decidió utilizar 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 y 1 ( $\mu\text{g/mL}$ ) como puntos de la curva de calibración.

Las condiciones utilizadas durante el estudio de cromatografía de líquidos de alta eficiencia se muestran en la tabla 1.

Estas condiciones se obtuvieron de una primera prueba por HPLC-SCAN, esta técnica consiste en hacer barridos a diferentes flujos de las fases móviles entre dos masas para tener una información total del contenido de la muestra e identificar los tiempos de retención de los analitos de interés.

Tabla 1.- Parámetros del análisis por HPLC-EM	
Fuente de Iones	Electropulverización
Rango de Solvente A ( $\text{H}_2\text{O}$ )	20%
Rango de Solvente B (ACN)	80%
Columna	ZORBAX EXTEND-C18 5UM, 4.6X150MM
Temperatura de Gas	300 °C
Flujo de Gas	10 L/min
Volumen inyectado	20 $\mu\text{L}$

Después de obtener los parámetros de HPLC para un análisis óptimo de las muestras se prosiguió a realizar un análisis de producto iónico HPLC-PI, el cual consiste en la fragmentación de la molécula de interés para observar los fragmentos característicos de la misma.

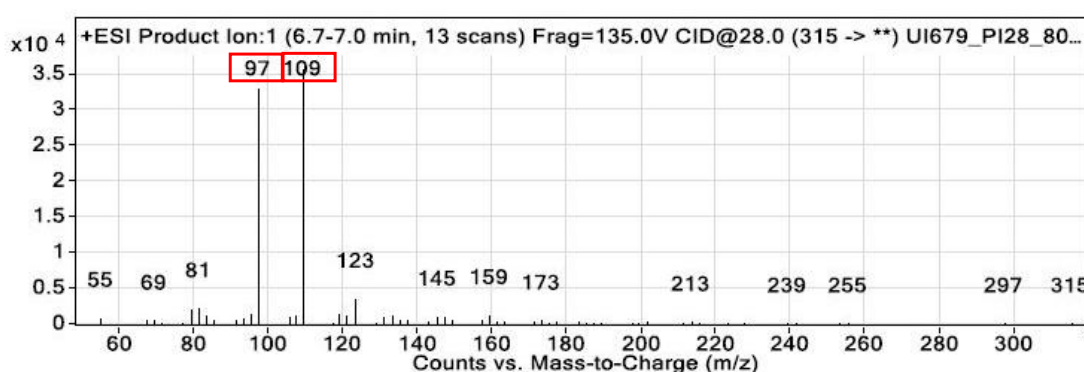
Se prosiguió a realizar los análisis de monitoreo de reacciones múltiples HPLC-MRM, el cual consiste en

## 8. Resultados

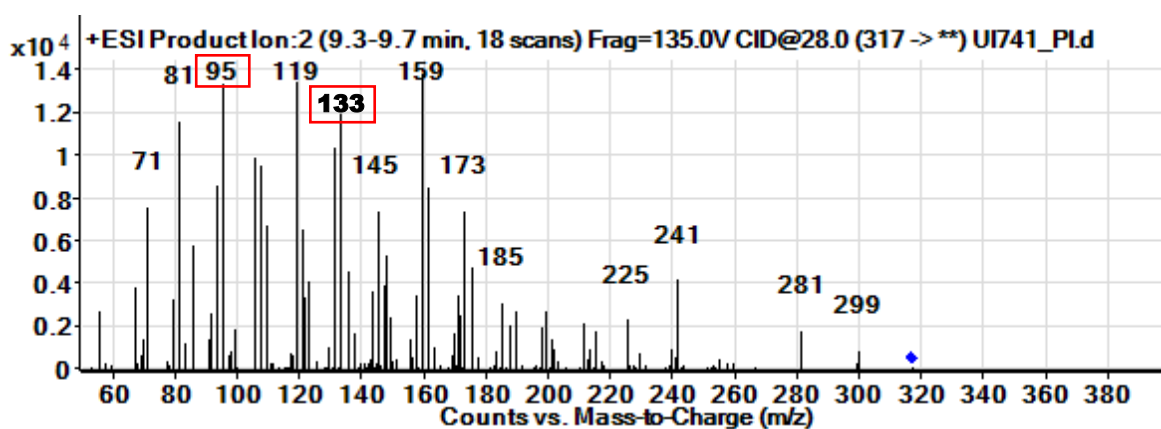
Tras la extracción de las hormonas, las disoluciones se mantuvieron en refrigeración y protegidas de la luz; estas muestras se enviaron al Departamento de Análisis por HPLC de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII)

de la Facultad de Química (FQ) de la UNAM, para realizar los estudios cromatográficos necesarios.

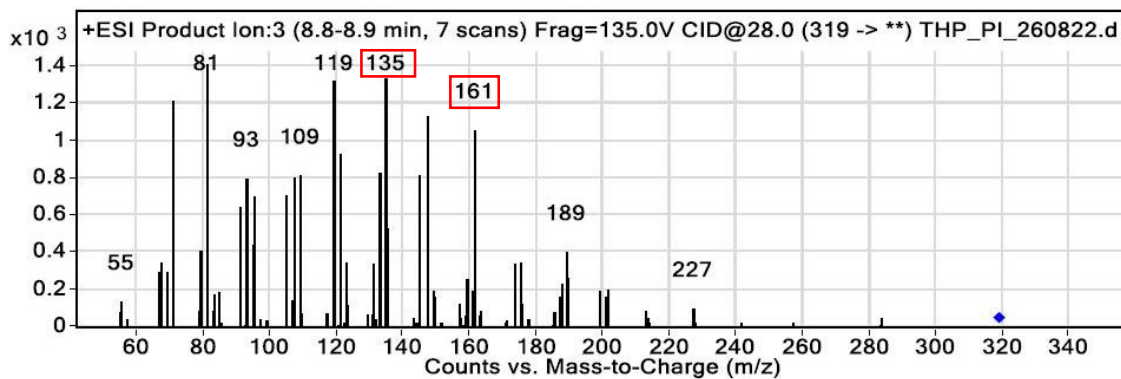
El estudio de producto iónico muestra que para la P<sub>4</sub> hay 2 iones característicos de abundancia relativa relevantes, el fragmento 97 y el fragmento 109 (Figura 13), para la 5 $\alpha$ -DHP hay 2 se obtuvieron varios iones característicos, de los cuales se eligieron monitorear el fragmento 95 y 133 (Figura 14); y para la 3 $\alpha$ -THP se observaron 4 iones característicos de abundancia relativa relevante, de los cuales se eligieron el fragmento 135 y el fragmento 161 (Figura 15) para su monitoreo.



**Figura 13.** Espectro de masas de la Progesterona. Los valores enmarcados en rojo muestran los fragmentos monitoreados para la P<sub>4</sub>.

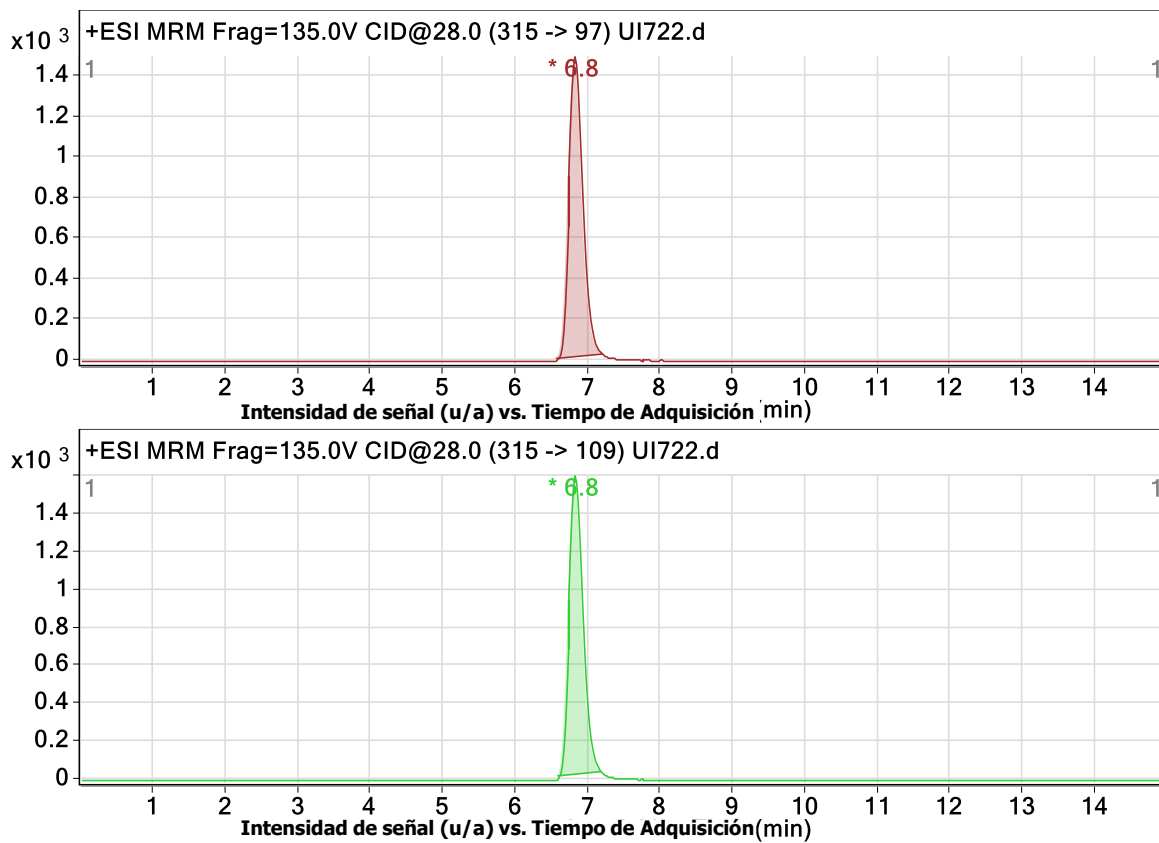


**Figura 14.** Espectro de masas de la Dihidroprogesterona. Los valores enmarcados en rojo muestran los fragmentos analizados para la 5 $\alpha$ -DHP.

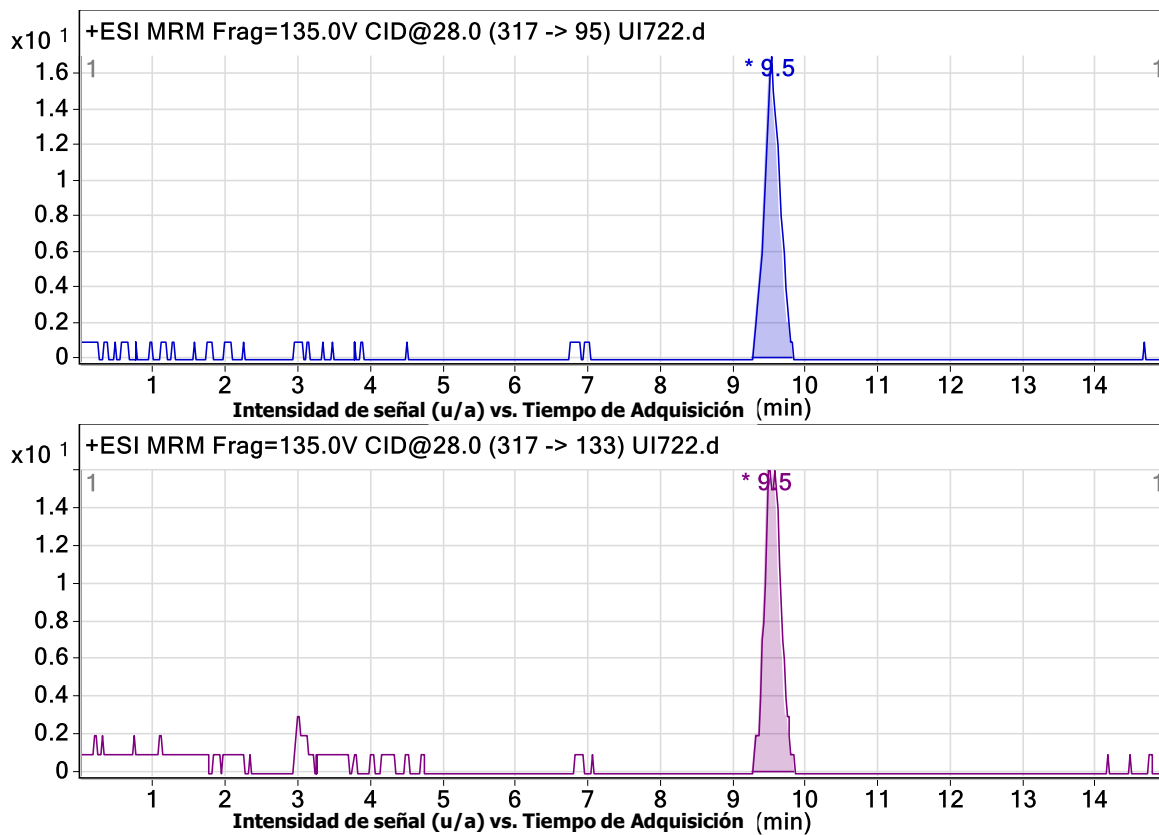


**Figura 15.** Espectro de masas de la Alopregnanolona. Los valores enmarcados en rojo muestran los fragmentos monitoreados para la 3 $\alpha$ -THP.

En el estudio de monitorización de reacciones múltiples se observaron que el tiempo de retención para los fragmentos elegidos de la P4 es de 6.8 min (Figura 16); para los fragmentos elegidos de la 5 $\alpha$ -DHP es de 9.5 min (Figura 17); y para los fragmentos elegidos de la 3 $\alpha$ -THP es de 8.8 y 9.4 min (Figura 18).

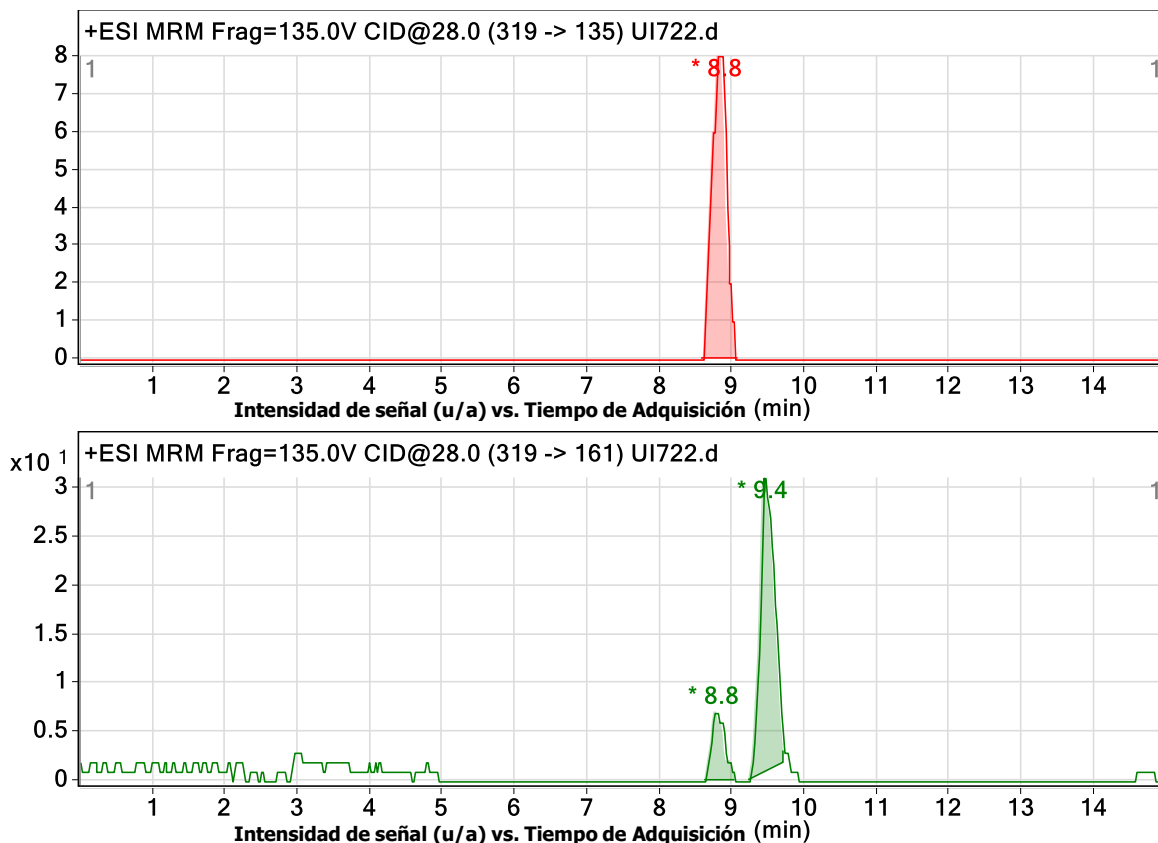


**Figura 16.** Cromatogramas del estándar de Progesterona. Monitorización de los fragmentos característicos de la P<sub>4</sub> con un tiempo de retención que inicia en 6.8 y termina en 7.2.



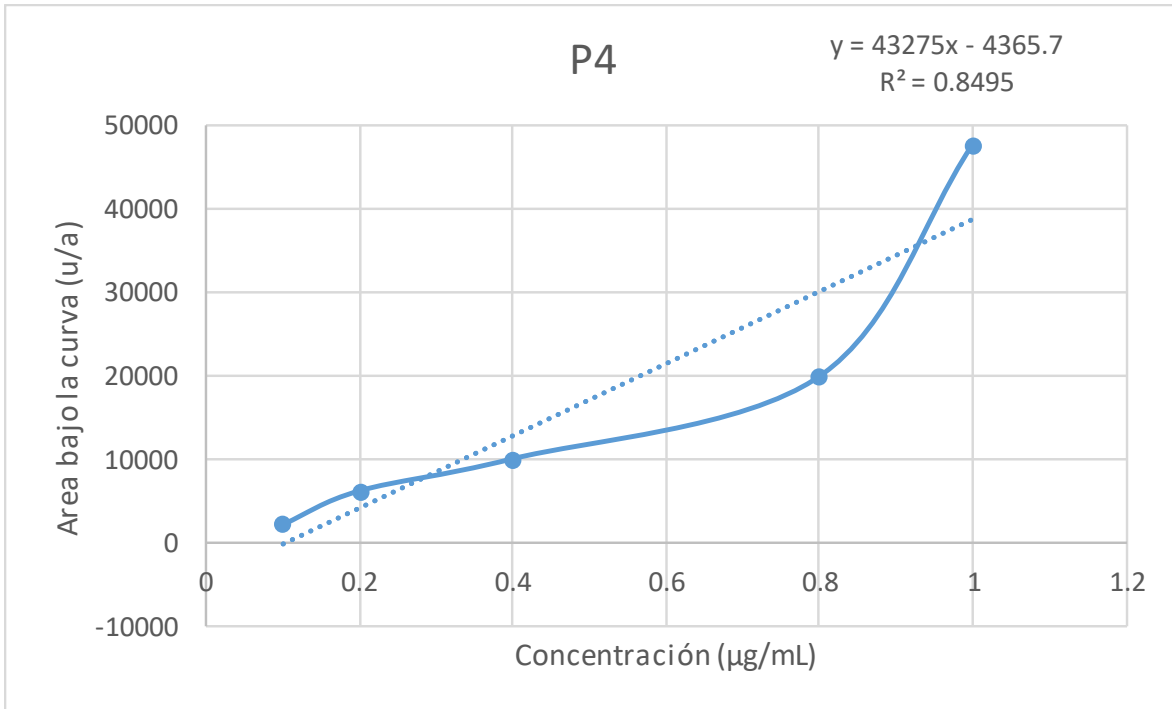
**Figura 17.** Cromatogramas de la Dihidroprogesterona. Monitorización de los fragmentos característicos de la 5 $\alpha$ -DHP con un tiempo de retención que inicia en 9.5 y termina en 9.8.



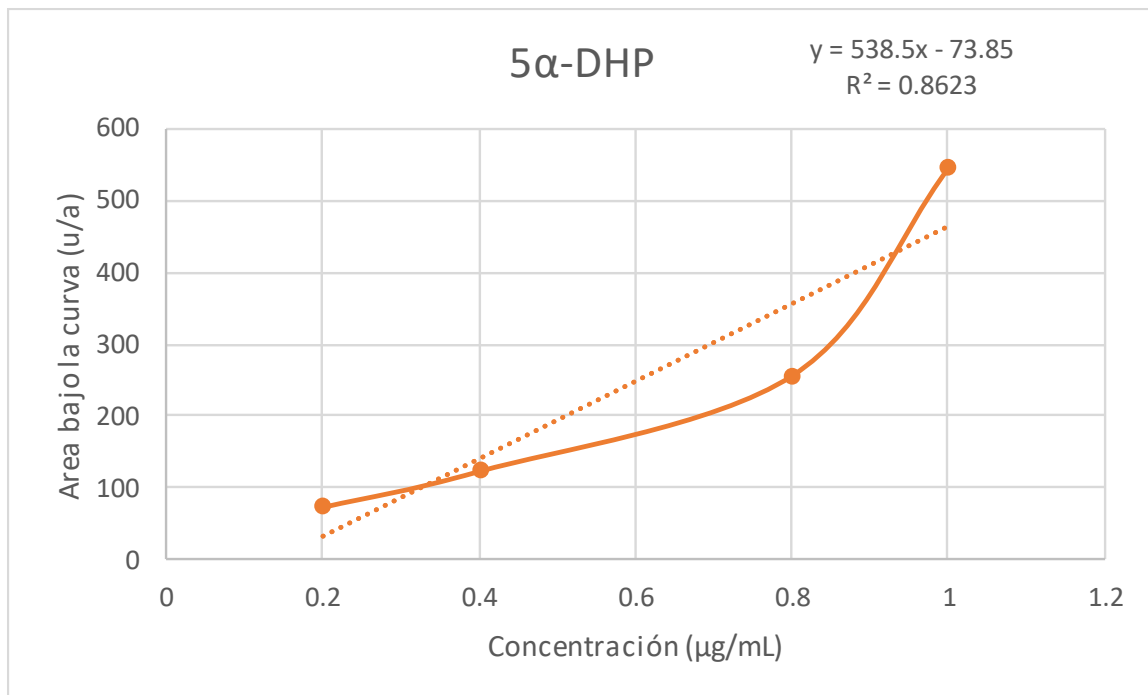


**Figura 18.** Cromatograma de la Alopregnanolona. Monitorización de los fragmentos característicos de la 3 $\alpha$ -THP con tiempos de retención que van de 8.8 a 9.1 (fragmento 135) y de 9.4 a 9.7 (fragmento 161).

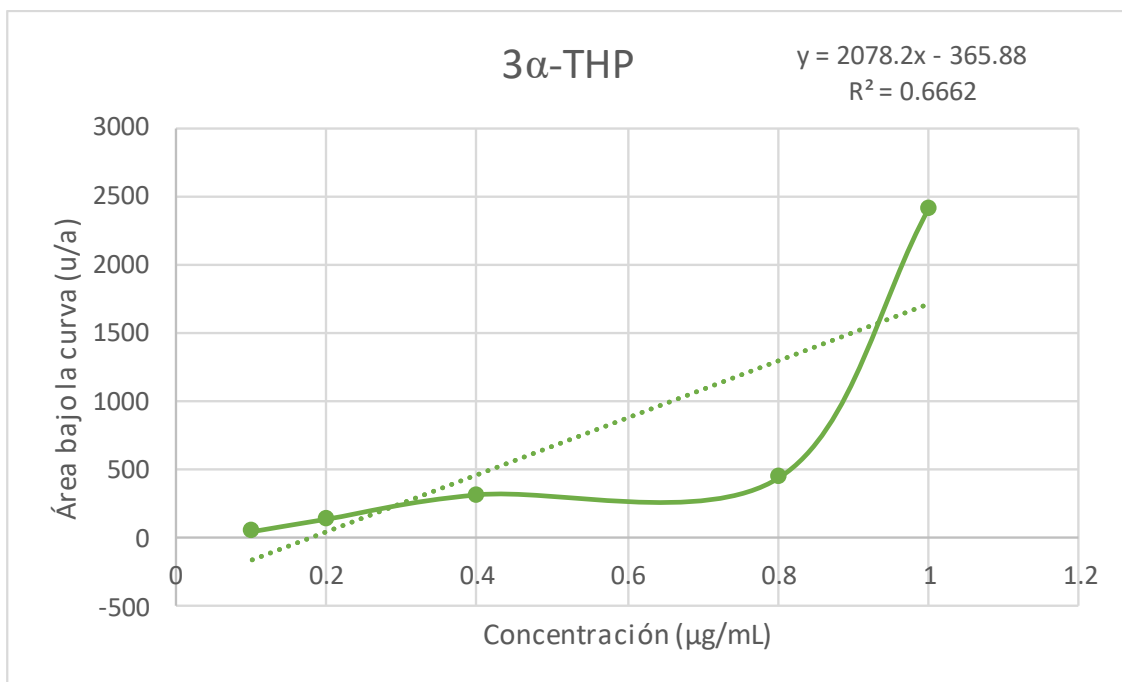
Con los cromatogramas de la curva de concentraciones conocidas se realizaron gráficas de área bajo la curva en función de la concentración (Gráficas 1, 2 y 3), de las cuales se obtuvieron las ecuaciones de recta y los coeficientes de correlación para calcular la concentración de las muestras obtenidas por interpolación. Debido a que las gráficas mostraban un comportamiento exponencial se procedió a realizar una linealización aplicando logaritmo a los datos obtenidos en el análisis de HPLC, con estos nuevos valores se obtuvieron graficas con comportamiento lineal (Graficas 4, 5 y 6).



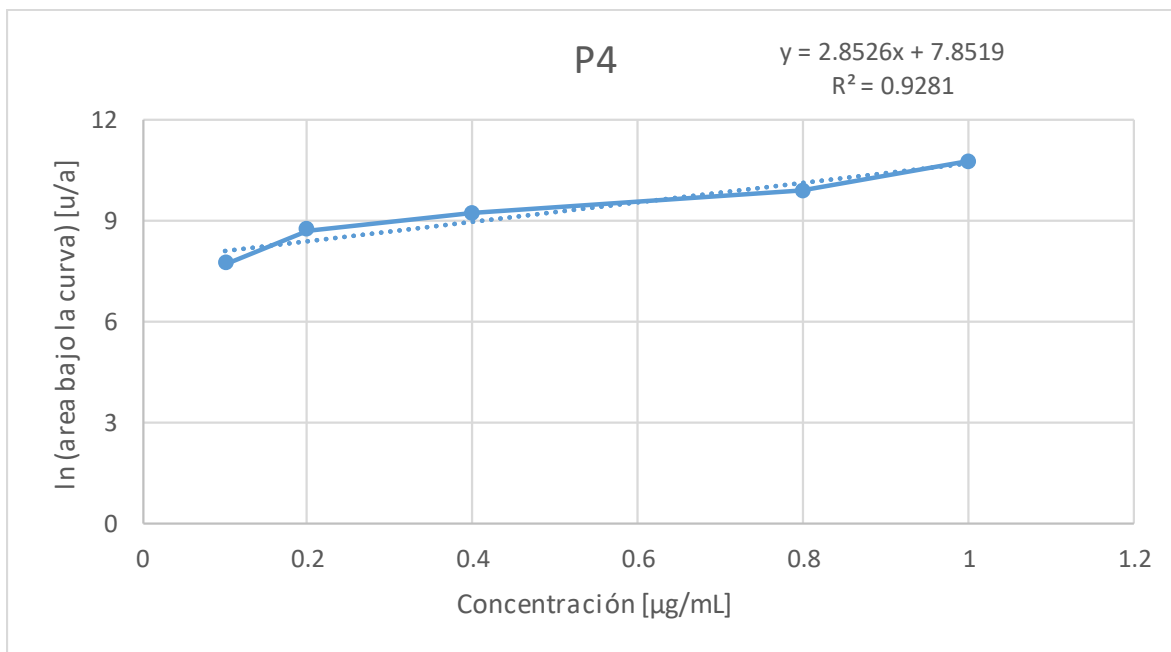
**Grafica 1.** Curva de calibración de la P<sub>4</sub>. Área bajo la curva en función de la concentración.



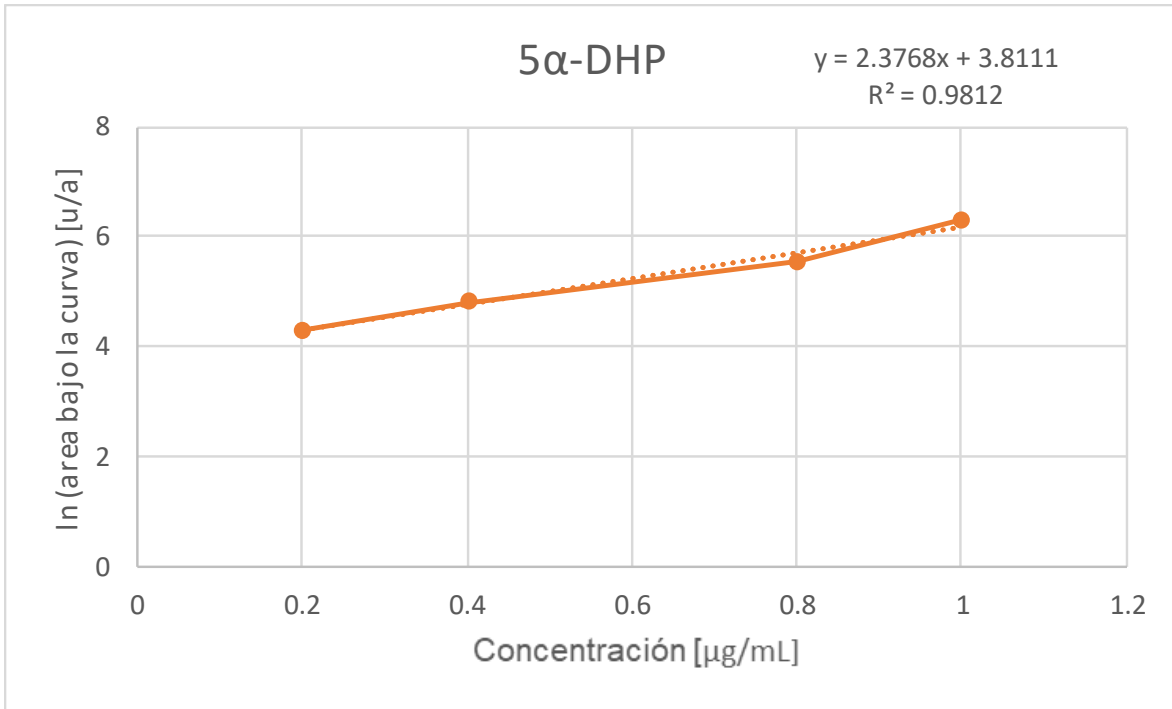
**Grafica 2.** Curva de calibración de la 5α-DHP. Área bajo la curva en función de la concentración.



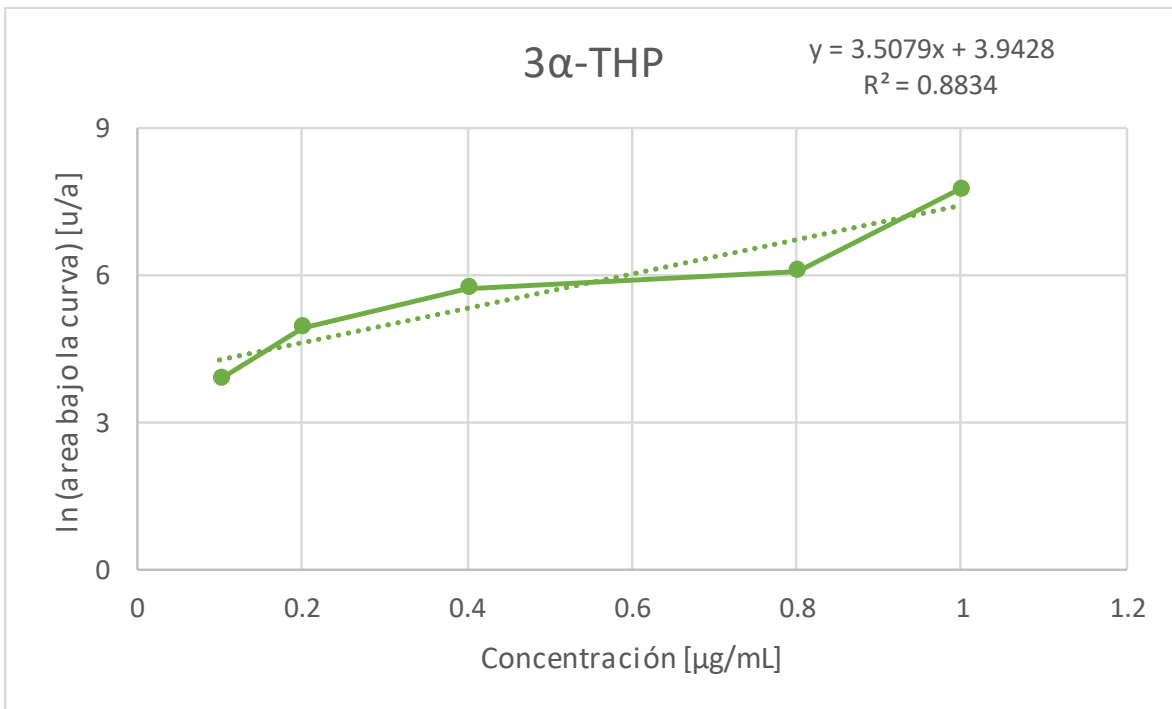
**Gráfica 3.** Curva de calibración para la 3α-THP. Área bajo la curva en función de la concentración.



**Gráfica 4.** Curva de calibración linealizada de la P<sub>4</sub>.



**Grafica 5.** Curva de calibración linealizada de la 5α-DHP.

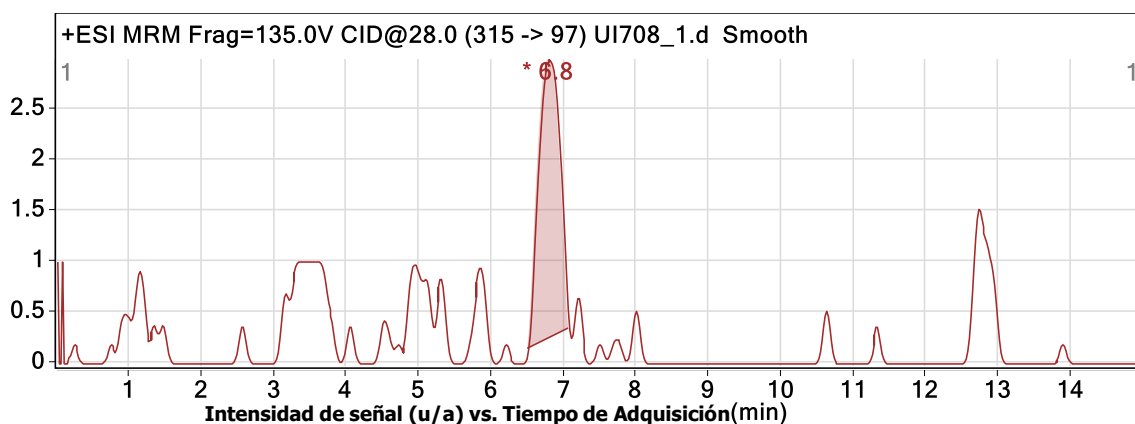


**Grafica 6.** Curva de calibración linealizada de la 3α-THP.

Sintetizando la información se obtiene la tabla 2, la cual contiene las ecuaciones de recta y los coeficientes de correlación extraídas de las curvas linealizadas para la P<sub>4</sub>, la 5α-DHP y la 3α-THP.

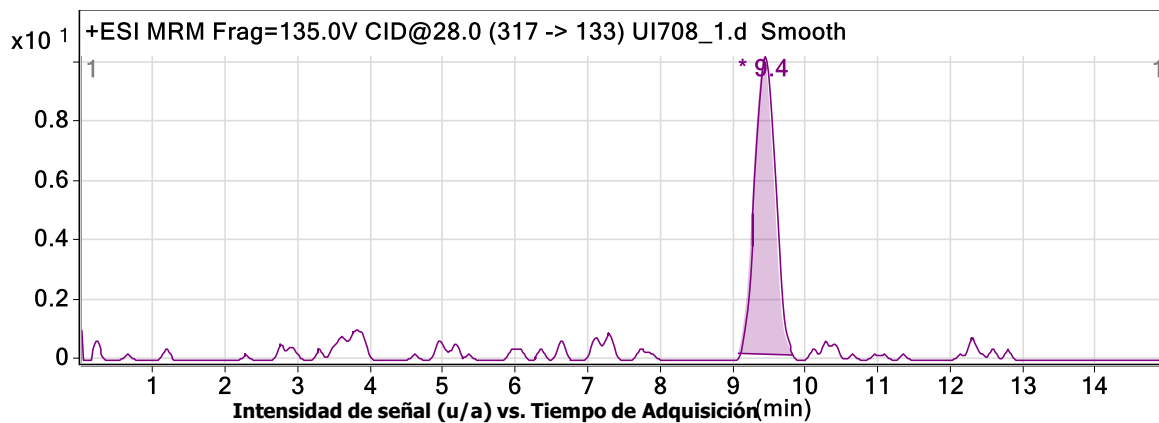
Tabla 2.- Ecuaciones de recta y coeficientes de correlación de la P <sub>4</sub> , DHP y THP	
Progesterona (P <sub>4</sub> )	$y = 2.8526x + 7.8519$ $R^2 = 0.9281$
5α-Dihidroprogesterona (5α-DHP)	$y = 2.3768x + 3.8111$ $R^2 = 0.9812$
Alopregnanolona (3α-THP)	$y = 3.5079x + 3.9428$ $R^2 = 0.8834$

De estas ecuaciones se despejó la variable “x”, la cual es la incógnita de interés que nos revela la concentración de la P<sub>4</sub>, la 5α-DHP y la 3α-THP, con el área bajo la curva de los cromatogramas que se obtuvieron de las muestras de células U251, que se muestran en las figuras 19, 20 y 21, se obtuvo que la concentración para P<sub>4</sub> fue de 23.4 µg/mL, para la 5α-DHP fue de 47.4 µg/mL, y para la 3α-THP de 47.5 µg/mL sólo en el caso de las células U251, las cuales se presentan en la tabla 3.



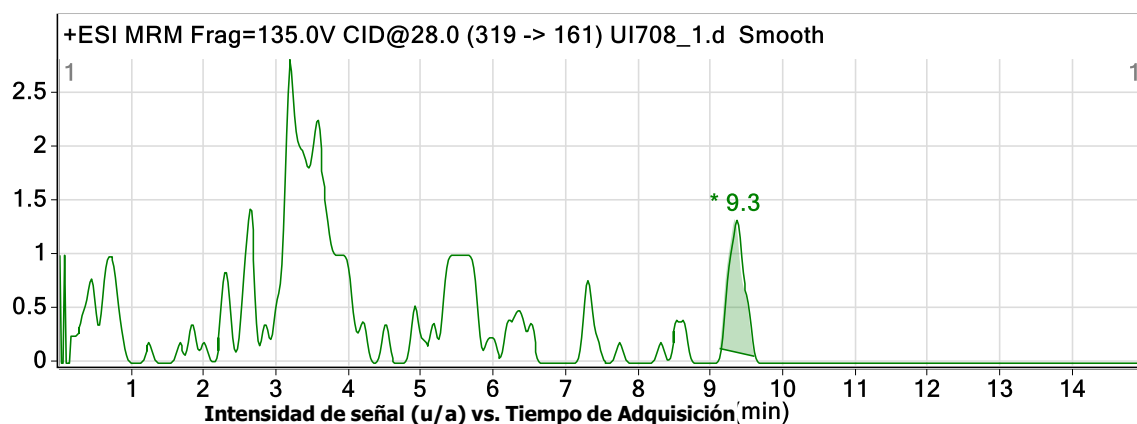
Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	6.5	6.8	7.1	3	58	100

**Figura 19.** Cromatograma y tabla de datos de la muestra extraída de células U251 para P<sub>4</sub>.



Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	9.1	9.4	9.8	10	197	100

**Figura 20.** Cromatograma y tabla de datos de la muestra extraída de células U251 para 5 $\alpha$ -DHP.

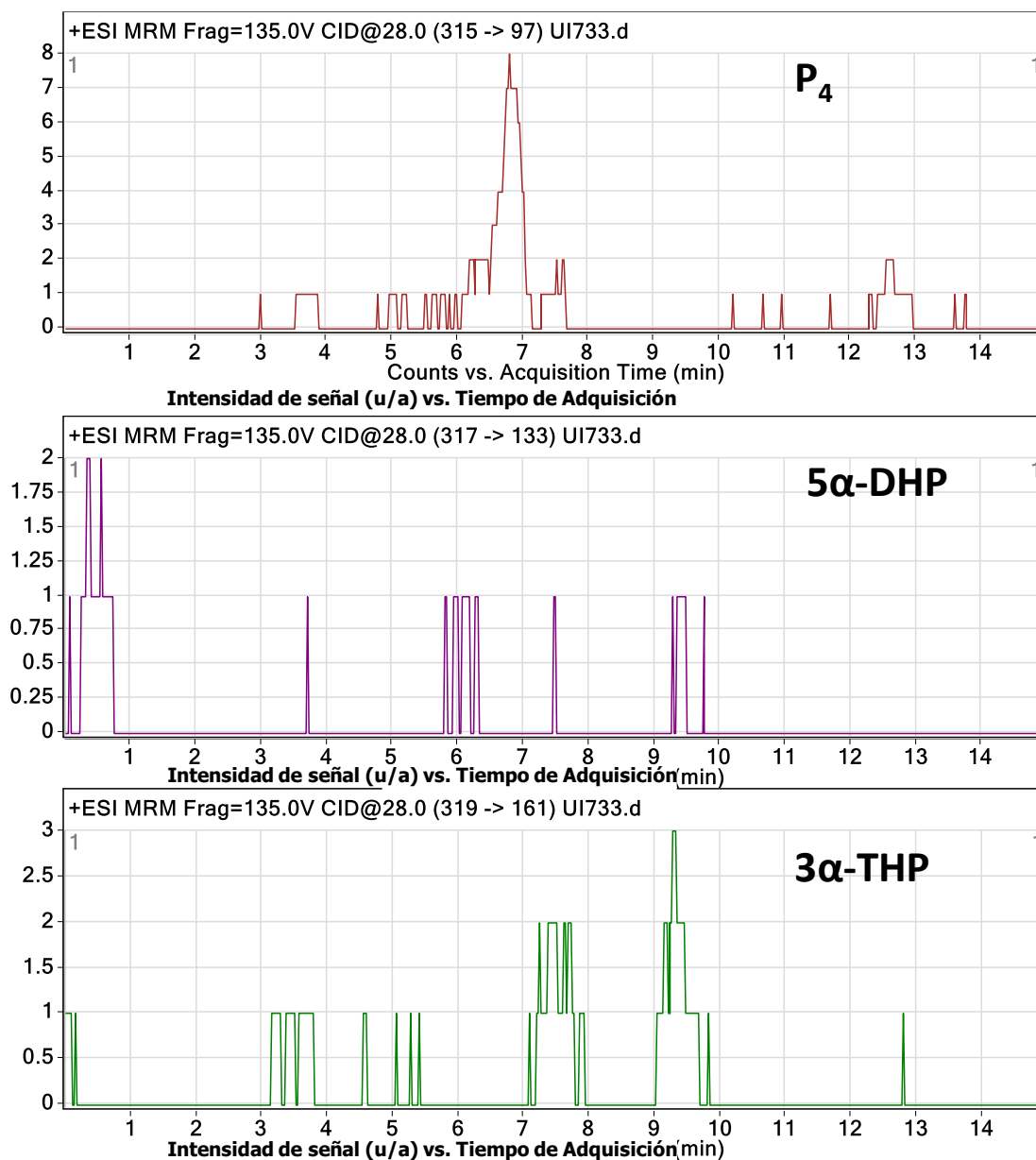


Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	9.3	9.5	9.9	45	19	100

**Figura 21.** Cromatograma y tabla de datos de la muestra extraída de células U251 para 3 $\alpha$ -THP.

Tabla 3.- Parámetros de las Ecuaciones de Rectas y concentraciones obtenidas.					
analito	y	m	b	X Conc. [ $\mu\text{g/mL}$ de extracto]	$\mu\text{g/cel}$
P4	59	2.8526	7.8519	17.9303	0.000001
5 $\alpha$ -DHP	109	2.3768	3.8111	44.2565	0.000002
3 $\alpha$ -THP	163	3.5079	3.9428	45.3426	0.000002
Cantidad de células			18300000		

Se realizaron los mismos experimentos bajo las mismas condiciones para las células U87. Desafortunadamente los cromatogramas obtenidos por HPLC de ésta línea celular no arrojaron datos cuantificables para su análisis (Figura 22).



**Figura 22.-** Cromatogramas de las muestras de la línea celular U87.

## 9. Discusión

La P4 y sus metabolitos son fundamentales no solo para el despliegue de caracteres secundarios o funciones reproductivas sino para el desarrollo y el funcionamiento del sistema nervioso central (SNC). Estos esteroides regulan la diferenciación, proliferación, morfología y funcionamiento de diferentes células del SNC. Además,



debido a su participación en la progresión del GB se ha considerado de suma importancia conocer la concentración y la capacidad del tejido afectado de sintetizar a la P<sub>4</sub> y de metabolizarla.

Analizando los espectros de masas de cada una de las moléculas podemos observar que para la P<sub>4</sub> hay dos fragmentos característicos, mientras que para la 5 $\alpha$ -DHP y la 3 $\alpha$ -THP se observan al menos cuatro, esto debido a que los espectros de masas se produjeron utilizando los estándares. Ya que extracto proviene de una muestra biológica se puede producir un *efecto matriz*, el cual puede disminuir la respuesta del instrumento a un determinado analito debido a la presencia de otros componentes. Aun así, aunque solo se utilizó la señal de un fragmento por cada molécula, los fragmentos monitoreados fueron los característicos y con abundancias relativas considerables para poder obtener su concentración.

Un dato más de que los fragmentos monitoreados son los característicos y representativos de las moléculas buscadas son sus tiempos de retención, en los cromatogramas de los estándares (figuras 16, 17 y 18) se observa que los tiempos de retención del fragmento monitoreado para la P<sub>4</sub> (m/z 97), la 5 $\alpha$ -DHP (m/z 133) y la 3 $\alpha$ -THP (m/z 161) concuerdan con los tiempos de retención de en los cromatogramas obtenidos para el extracto.

Al obtener los gráficos de las curvas de calibración se observó que su comportamiento no es lineal, por lo que se procedió a realizarse una linealización aplicando logaritmo a los valores del área bajo la curva, para obtener una mejor correlación entre los datos y así obtener la concentración de los analitos con mayor certeza en el modelo matemático.

Al observar los datos de la tabla 3, se puede aseverar que las células U251 derivadas de GB humano sintetizan P<sub>4</sub> y la metabolizan, generando sus metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos. Resulta interesante que las concentraciones de 5 $\alpha$ -DHP y la 3 $\alpha$ -THP sea mayor que la de P<sub>4</sub>. Esto puede sugerir que la 5 $\alpha$ -reductasa puede encontrarse ampliamente expresada o tener una gran actividad actividad en células U251, cabe

aclarar también que la reacción de reducción de P<sub>4</sub> a 5 $\alpha$ -DHP es un paso irreversible, y que la 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\alpha$ -HSD), encargada de reducir la 5 $\alpha$ -DHP a 3 $\alpha$ -THP, se encuentra en un rango de expresión o actividad igual a la de la 5 $\alpha$ -reductasa en estas células.

Para las células U87 cabe la posibilidad de que no sean capaces de sintetizar P<sub>4</sub> y, por lo tanto, la obtengan por algún otro medio.

No puede rechazarse la idea de que puedan tener capacidad de síntesis y metabolismo de la P<sub>4</sub>. Por esto, hay mejoras que pueden implementarse en el desarrollo experimental como aumentar la cantidad de células cultivadas y/o cambiar el proceso de extracción de líquido-líquido a microextracción en fase sólida ( $\mu$ EFS). Estas modificaciones pueden tener resultados positivos y cuantificables para esta y otras líneas celulares.

Estos son datos importantes, debido a que este estudio aporta información sobre la concentración de P<sub>4</sub> y sus metabolitos 5 $\alpha$ -derivados en este tipo de neoplasia.

## 10. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que:

1.- Se desarrolló un método de extracción líquido-líquido para la extracción de P<sub>4</sub>, 5 $\alpha$ -DHP y 3 $\alpha$ -THP.

2.- Se determinaron las concentraciones de la P<sub>4</sub>, la 5 $\alpha$ -DHP y la 3 $\alpha$ -THP, por medio de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectroscopía de masas (HPLC-MS).

## 11. Referencias

1. Ostrom, Q. T. *et al.* CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro-Oncology* (2018) doi:10.1093/neuonc/noy131.
2. Weller, M. *et al.* Glioma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, (2015).
3. Miller, K. D. *et al.* Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 381–406 (2021).
4. Camacho-arroyo, I., Gonz, G. & Cerb, M. A. Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas. 1–7 (2000).
5. Ondarza, R., Gamboa-domí, A., Cerbo, M. A. & Camacho-arroyo, I. Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. **56**, 43–48 (2001).
6. Gonza, Æ. D., Andre, Æ., Cabrera-mun, Æ. E. & Camacho-arroyo, I. Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. 129–135 (2007) doi:10.1007/s12020-007-9023-0.
7. Theis, V. & Theiss, C. Progesterone Effects in the Nervous System. *Anat. Rec.* **302**, 1276–1286 (2019).
8. Zamora-Sánchez, C. J., Hansberg-Pastor, V., Salido-Guadarrama, I., Rodríguez-Dorantes, M. & Camacho-Arroyo, I. Allopregnanolone promotes proliferation and differential gene expression in human glioblastoma cells. *Steroids* (2017) doi:10.1016/j.steroids.2017.01.004.
9. Zamora-Sánchez, C. J., Hernández-Vega, A. M., Gaona-Domínguez, S., Rodríguez-Dorantes, M. & Camacho-Arroyo, I. 5Alpha-Dihydroprogesterone Promotes Proliferation and Migration of Human Glioblastoma Cells. *Steroids* **163**, 108708 (2020).
10. Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D. & Wrensch, M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **2**, 494–503 (2006).
11. Carrano, A., Juarez, J. J., Incontri, D., Ibarra, A. & Cazares, H. G. Sex-specific differences in glioblastoma. *Cells* **10**, 1–22 (2021).
12. Bello-Alvarez, C. & Camacho-Arroyo, I. Impact of sex in the prevalence and progression of glioblastomas: the role of gonadal steroid hormones. *Biol. Sex Differ.* **12**, 1–13 (2021).

13. Franco-Hernández, C., Martínez-Glez, V. & Rey, J. A. Biología molecular de los glioblastomas. *Neurocirugia* **18**, 373–382 (2007).
14. Ostrom, Q. T., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C. & Barnholtz-Sloan, J. S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. *Neuro. Oncol.* **23**, III1–III105 (2021).
15. Castañeda, C. Glioblastoma : Análisis Molecular Y Glioblastoma : Molecular Analysis and Its Clinical. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* **32**, 316–325 (2015).
16. Kakkar, A. *et al.* Loss of heterozygosity on chromosome 10q in glioblastomas, and its association with other genetic alterations and survival in Indian patients. *Neurol. India* **59**, 254–261 (2011).
17. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am. J. Pathol.* **170**, 1445–1453 (2007).
18. Quigley, M. R., Post, C. & Ehrlich, G. Some speculation on the origin of glioblastoma. *Neurosurg. Rev.* **30**, 16–21 (2007).
19. Sanai, N., Alvarez-Buylla, A. & Berger, M. S. Mechanisms of disease: Neural stem cells and the origin of gliomas. *N. Engl. J. Med.* **353**, 811–822 (2005).
20. Yoon, S. J. *et al.* Glioblastoma cellular origin and the firework pattern of cancer genesis from the subventricular zone. *J. Korean Neurosurg. Soc.* **63**, 26–33 (2020).
21. Wick, W., Osswald, M., Wick, A. & Winkler, F. Treatment of glioblastoma in adults. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **11**, 1–13 (2018).
22. pruthi, deep shankar. Extended Duration of Adjuvant Temozolomide in Glioblastoma Multiforme – A Review of Trials. *Eurasian J. Med. Oncol.* **5**, 217–221 (2021).
23. Camacho Arroyo, I. Las hormonas sexuales y el cerebro. *¿Cómo ves?* 10–14 (2002).
24. Wells, J. C. K. Sexual dimorphism of body composition. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **21**, 415–430 (2007).
25. Gardner, D. G. *básica y clínica Décima edición.* (2018).
26. Wade, L. D. Química Organica, vol 2. *Development* **2**, 661 (2011).
27. Miller, W. L. & Auchus, R. J. The “backdoor pathway” of androgen synthesis in human male sexual development. *PLoS Biol.* **17**, 2–7 (2019).
28. Hanamura, T. *et al.* Possible role of the aromatase-independent steroid metabolism

- pathways in hormone responsive primary breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.* **143**, 69–80 (2014).
29. Original, T. Neuroesteroides y esteroides sexuales en el sistema nervioso central . Neurosteroids and Sex Steroids in the Central Nervous System . **42**, 3–6 (2005).
  30. Tsutsui, K., Matsunaga, M. & Ukena, K. Biosynthesis and biological actions of neurosteroids in the avian brain. *Avian Poult. Biol. Rev.* **14**, 63–78 (2003).
  31. Baulieu, E. E. Neurosteroids: A novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* vol. 23 963–987 (1998).
  32. Camacho-Arroyo, I., Piña-Medina, A. G., Bello-Alvarez, C. & Zamora-Sánchez, C. J. *Sex hormones and proteins involved in brain plasticity. Vitamins and Hormones* vol. 114 (Elsevier Inc., 2020).
  33. Contrò, V., R. Basile, J. & Proia, P. Sex steroid hormone receptors, their ligands, and nuclear and non-nuclear pathways. *AIMS Mol. Sci.* **2**, 294–310 (2015).
  34. PubMed. 17/12/2020. *National Institute of Health* (2020) doi:10.5517/cc7p1mk.
  35. Malgor-Valsecia. Sección Iv : Capítulo 26 : -Farmacología De Las Hormonas Sexuales Femeninas . *Estrógenos. Antiestrógenos. Progesterona. Progestágenos. Antiprogestágenos Anticoncept. Horm.* 192–210 (2016).
  36. Miller, W. L. Disorders in the initial steps of steroid hormone synthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **165**, 18–37 (2017).
  37. Melcangi, R. C. *et al.* Levels and actions of progesterone and its metabolites in the nervous system during physiological and pathological conditions. *Prog. Neurobiol.* **113**, 56–69 (2014).
  38. Chien, Y., Rosal, K. & Chung, B. chu. Function of CYP11A1 in the mitochondria. *Mol. Cell. Endocrinol.* **441**, 55–61 (2017).
  39. Dumont, M. Characterization, expression, and immunohistochemical localization of.pdf. 415–421 (1992).
  40. Taraborrelli, S. Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **94**, 8–16 (2015).
  41. Schumacher, M. *et al.* Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves. *Brain Res. Rev.* **37**, 343–359 (2001).
  42. González-orozco, J. C. & Camacho-arroyo, I. Progesterone Actions During Central

- Nervous System Development. **13**, 1–14 (2019).
43. He, J., Evans, C. O., Hoffman, S. W., Oyesiku, N. M. & Stein, D. G. Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* **189**, 404–412 (2004).
  44. Camacho-arroyo, I., Química, I. N. D. P. De, Nacional, U. & México, A. De. *Mechanism of Progesterone Action in the Brain*. vol. 3 (2017).
  45. Skildum, A., Faivre, E. & Lange, C. A. Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen-activated protein kinases. *Mol. Endocrinol.* **19**, 327–339 (2005).
  46. Lange, C. A. Integration of progesterone receptor action with rapid signaling events in breast cancer models. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **108**, 203–212 (2008).
  47. Proietti, C. *et al.* Progesterone Induces Transcriptional Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-Dependent Mechanism in Breast Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4826–4840 (2005).
  48. Atif, F., Yousuf, S. & Stein, D. G. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme : Role of PI3K / Akt / mTOR signaling. **146**, 62–73 (2015).
  49. Béguelin, W. *et al.* Progesterone Receptor Induces ErbB-2 Nuclear Translocation To Promote Breast Cancer Growth via a Novel Transcriptional Effect: ErbB-2 Function as a Coactivator of Stat3. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 5456–5472 (2010).
  50. Lee, T. S., Lin, J. J., Huo, Y. N. & Lee, W. Sen. Progesterone inhibits endothelial cell migration through suppression of the rho activity mediated by csrc activation. *J. Cell. Biochem.* **116**, 1411–1418 (2015).
  51. Cahill, M. A. & Neubauer, H. Pgrmc proteins are coming of age: A special issue on the role of pgrmc1 and pgrmc2 in metabolism and cancer biology. *Cancers (Basel)*. **13**, 1–8 (2021).
  52. Thomas, P. Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPR $\alpha$ ) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions. *Front. Neuroendocrinol.* **29**, 292–312 (2008).
  53. Del Moral-Morales, A., González-Orozco, J. C., Capetillo-Velázquez, J. M., Piña-Medina, A. G. & Camacho-Arroyo, I. The Role of mPR $\delta$  and mPR $\epsilon$  in Human

- Glioblastoma Cells: Expression, Hormonal Regulation, and Possible Clinical Outcome. *Horm. Cancer* **11**, 117–127 (2020).
54. Wang, C., Liu, Y. & Cao, J. M. G protein-coupled receptors: Extranuclear mediators for the non-genomic actions of steroids. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 15412–15425 (2014).
  55. Thomas, P. *et al.* Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progestin membrane receptor  $\alpha$  subtypes and their evolutionary origins. *Endocrinology* **148**, 705–718 (2007).
  56. Nakashima, M. *et al.* Cell-based assay of nongenomic actions of progestins revealed inhibitory G protein coupling to membrane progestin receptor  $\alpha$  (mPR $\alpha$ ). *Steroids* **100**, 21–26 (2015).
  57. Karteris, E. *et al.* Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: Potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Mol. Endocrinol.* **20**, 1519–1534 (2006).
  58. Charles, N. J., Thomas, P. & Lange, C. A. Expression of Membrane Progesterone Receptors (mPR/PAQR) in Ovarian Cancer Cells: Implications for Progesterone-Induced Signaling Events. *Horm. Cancer* **1**, 167–176 (2010).
  59. Tan, W. & Thomas, P. Activation of the Pi3k/Akt pathway and modulation of phosphodiesterase activity via membrane progestin receptor-alpha (mPRalpha) regulate progestin-initiated sperm hypermotility in Atlantic croaker. *Biol. Reprod.* **90**, 1–11 (2014).
  60. Sueldo, C., Liu, X. & Peluso, J. J. Progestin and adipoq receptor 7, progesterone membrane receptor component 1 (PGRMC1), and PGRMC2 and their role in regulating progesterone's ability to suppress human granulosa/luteal cells from entering into the cell cycle. *Biol. Reprod.* **93**, 1–11 (2015).
  61. Lösel, R. M., Besong, D., Peluso, J. J. & Wehling, M. Progesterone receptor membrane component 1-Many tasks for a versatile protein. *Steroids* **73**, 929–934 (2008).
  62. Peluso, J. J., Romak, J. & Liu, X. Progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) is the mediator of progesterone's antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells as revealed by PGRMC1 small interfering ribonucleic acid treatment and functional analysis of PGRMC1 m. *Endocrinology* **149**, 534–543

- (2008).
63. Melcangi, R. C., Garcia-Segura, L. M. & Mensah-Nyagan, A. G. Neuroactive steroids: State of the art and new perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 777–797 (2008).
  64. Giuliani, F. A. *et al.* Allopregnanolone and puberty: Modulatory effect on glutamate and GABA release and expression of 3 $\alpha$ -hydroxysteroid oxidoreductase in the hypothalamus of female rats. *Neuroscience* **243**, 64–75 (2013).
  65. Yokoi, H. *et al.* Steroid 5 $\alpha$ -reductase type 1 immunolocalized in the anterior pituitary of intact and castrated male rats. *Histochem. Cell Biol.* **106**, 359–366 (1996).
  66. Wiebe, J. P., Lewis, M. J., Cialacu, V., Pawlak, K. J. & Zhang, G. The role of progesterone metabolites in breast cancer: Potential for new diagnostics and therapeutics. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **93**, 201–208 (2005).
  67. Schumacher, M., Zhu, X. & Guennoun, R. *Progesterone: Synthesis, Metabolism, Mechanism of Action, and Effects in the Nervous System. Hormones, Brain and Behavior* vol. 3 (Elsevier, 2017).
  68. Wiebe, J. P. *et al.* The 4-pregnene and 5 $\alpha$ -pregnane progesterone metabolites formed in nontumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion. *Cancer Res.* **60**, 936–943 (2000).
  69. Tatiana, L. *et al.* Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology Effect of progesterone and first evidence about allopregnanolone action on the progression of epithelial human ovarian cancer cell lines. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **196**, 105492 (2020).
  70. Pawlak, K. J., Zhang, G. & Wiebe, J. P. Membrane 5 $\alpha$ -pregnane-3,20-dione (5 $\alpha$ P) receptors in MCF-7 and MCF-10A breast cancer cells are up-regulated by estradiol and 5 $\alpha$ P and down-regulated by the progesterone metabolites, 3 $\alpha$ -dihydroprogesterone and 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone, with associated changes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **97**, 278–288 (2005).
  71. Wiebe, J. P., Rivas, M. A., Mercogliano, M. F., Elizalde, P. V. & Schillaci, R. Progesterone-induced stimulation of mammary tumorigenesis is due to the progesterone metabolite, 5 $\alpha$ -dihydroprogesterone (5 $\alpha$ P) and can be suppressed by the 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, finasteride. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **149**, 27–34 (2015).



72. Wiebe, J. P., Pawlak, K. J. & Kwok, A. Mechanism of action of the breast cancer-promoter hormone, 5 $\alpha$ -dihydroprogesterone (5 $\alpha$ P), involves plasma membrane-associated receptors and MAPK activation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **155**, 166–176 (2016).
73. Germán-castelán, L., Manjarrez-marmolejo, J., González-arenas, A., González-morán, M. G. & Camacho-arroyo, I. Progesterone Induces the Growth and Infiltration of Human Astrocytoma Cells Implanted in the Cerebral Cortex of the Rat. **2014**, (2014).
74. Miller, J. M. *Concepts and Contrasts*. (2005).
75. Douglas A. Skoog. *Principios de Análisis Instrumental*. (2008).
76. Jurado, C. vitamina D3 en alimentos por HPLC con vitamina D2 como estandar interno.pdf. (2019).
77. Akram, N. M. A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Int. J. Res. Appl. Sci. Eng. Technol.* **6**, 488–492 (2018).
78. Crouch, S. H. Douglas A. Skoog - Principios de análisis instrumental-Cengage Learning (2019). (2019).
79. Departamento de Ingeniería Química. Tema 4. Cromatografía De Líquidos De Alta Resolución. *Univ. Alicant.* 0–31 (2008).
80. Miranda, A; Martín, O. Cromatografía Líquida. *Amphetamine, MDMA, Metamphetamine* 10 (2005).
81. Caco, D. *Separaciones por cromatografía*. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (2005).
82. García, A. & Yusá, D. *HPLC Instrumental*. *Universida Politecnica de Valencia* vol. 5 (2016).
83. Esquivel Soto, E., Leal Guadarrama, L. (Instituto de Biotecnología, U. Instituto de biotecnología. (2004).
84. Kotas, T. *et al. Biosensors and Biodetection. Language, Society and Power. An Introduction* vol. 1572 (Springer New York, 2017).
85. Nadarajah, N., Skadberg, Ø., Adaway, J. & Brede, C. Multiplexed analysis of steroid hormones in saliva by LC-MS/MS with 2-hydrazinopyridine derivatization. *Clin. Mass Spectrom.* **4–5**, 1–10 (2017).

86. Hala, D., Overturf, M. D., Petersen, L. H. & Huggett, D. B. Quantification of 2-hydrazinopyridine derivatized steroid hormones in fathead minnow (*Pimephales promelas*) blood plasma using LC-ESI+/MS/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **879**, 591–598 (2011).
87. Gravitte, A., Archibald, T., Cobble, A., Kennard, B. & Brown, S. Liquid chromatography–mass spectrometry applications for quantification of endogenous sex hormones. *Biomed. Chromatogr.* **35**, (2021).
88. Ceglarek, U. *et al.* Rapid quantification of steroid patterns in human serum by on-line solid phase extraction combined with liquid chromatography-triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta* **401**, 114–118 (2009).
89. Gao, W., Stalder, T. & Kirschbaum, C. Quantitative analysis of estradiol and six other steroid hormones in human saliva using a high throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay. *Talanta* **143**, 353–358 (2015).
90. Son, H. H., Yun, W. S. & Cho, S. Development and validation of LC-MS / MS method for urinary 39 steroid ( estrogens , androgens , corticoids , and progestins ) profiling. *Biomed. Chromatogr.* **34**, (2020).
91. Taves, M. D., Ma, C., Heimovics, S. A., Saldanha, C. J. & Soma, K. K. Measurement of steroid concentrations in brain tissue: Methodological considerations. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2**, 1–13 (2011).
92. Gross, J. H. *Mass Spectrometry*. (Springer, 2004).
93. Luis. *Espectrometria de masas*. 72 (2011).
94. Talha, M. & Technology, I. Mass to charge ratio ... • Mass spectrometers consist of five basic parts : (2020).
95. El-Aneed, A., Cohen, A. & Banoub, J. Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Appl. Spectrosc. Rev.* **44**, 210–230 (2009).
96. Bramer, S. E. Van. *An introduction to mass spectrometry*. (1998)  
doi:10.1002/9780470921371.