

Original

Modelación molecular de cinco flavonoides como antagonistas del receptor de hidrocarburos de arilo. Potencialidades para la salud y producción animal

Molecular Modelling of Five Flavonoids as Antagonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor Potentialities for Health and Animal Production

Oscar Guillermo Collado García ^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-5351-7140>

Silvio José Martínez Sáez ² <https://orcid.org/0000-0002-1835-6318>

José Alberto Bertot Valdés ³ <https://orcid.org/0000-0003-1562-6754>

Hans De Winter ⁴ <https://orcid.org/0000-0002-4450-7677>

Enrique Molina ⁵ <https://orcid.org/0000-0002-5539-0347>

Paul Cos ⁶ <https://orcid.org/0000-0003-4361-8911>

¹ Dpto. Química. Facultad de Ciencias Aplicadas. Universidad de Camagüey "Ignacio Agramonte Loynaz". Camagüey. Cuba.

² Facultad de Ciencias agropecuarias. Universidad de Camagüey "Ignacio Agramonte Loynaz". Camagüey. Cuba.

³ Departamento de Veterinaria, Facultad de Ciencias agropecuarias. Universidad de Camagüey "Ignacio Agramonte Loynaz". Camagüey. Cuba.

⁴ Laboratory for Medicinal Chemistry. Department of Pharmaceutical Science, Faculty of Pharmaceutical, Biomedical and Veterinary Sciences, University of Antwerp, Universiteitsplein 1, 2610 Antwerp, Belgium.

⁵ Dpto. Química. Facultad de Ciencias Aplicadas. Universidad de Camagüey "Ignacio Agramonte Loynaz". Camagüey. Cuba.

⁶ Laboratory for Microbiology, Parasitology and Hygiene (LMPH), Department of Pharmaceutical Science, Faculty of Pharmaceutical, Biomedical and Veterinary Sciences, University of Antwerp, Universiteitsplein 1, 2610 Antwerp, Belgium.

* Autor para la correspondencia(email): ogcolladogarcia@gmail.com

RESUMEN

Antecedentes: El receptor de arilo de hidrocarburos (AHR) juega un papel importante en el desarrollo de la glándula mamaria, se relaciona con el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) que regula diversos procesos celulares, por lo que su sobreexpresión puede provocar procesos patológicos en los animales y afectar su salud y producción.

Materiales y Métodos: Se investigaron las moléculas de flavonoides 3-Metilluteolina, Kaempferol, Resveratrol, Miricetina y Quercetina. Para el modelado se utilizaron las estructuras de AHR:ARNT obtenidas del programa Swiss Model, para el acoplamiento el programa MOE 2019.01., y para la determinación de interacciones proteína-proteína (IPP) y mutaciones de alanina, los servidores Cocomaps (bioCOMplexes Contact MAPS) y Robetta y Rosetta Backrub, respectivamente.

Resultados: Los flavonoides estudiados se unen a interfaces de contacto a nivel de los dominios bHLH, PAS-A y las interfaces bHLH/PAS-A y PAS-A/PAS-B de la AHR y pueden exhibir un comportamiento antagonístico debido a las interacciones a nivel de las superficies de contacto para bloquear o modular las interacciones proteína-proteína entre AHR y ARNT.

Conclusiones: Los cinco flavonoides pueden interactuar a nivel de diferentes interfaces superficiales del AHR para modular la formación del heterodímero funcional, actuando como agentes antagonistas. El orden de probabilidad de estas acciones es mayor con 3-Metilluteolina, Kaempferol, Resveratrol y menor con Miricetina y Quercetina. La suplementación del pienso con follaje rico en estos flavonoides podría mejorar la salud y la producción animal.

Palabras clave: Nutrición animal, Receptor de Hidrocarburos de Arilo, Flavonoides, Reproducción, Factores de Transcripción. (*Fuente: DeCS*)

ABSTRACT

Background: The Aryl hydrocarbon receptor (AHR) plays a significant role in the development of the mammary gland, as it is related to the transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), which regulates several cellular processes. Hence, its overexpression may lead to pathological processes in the animals, and affect their health and production.

Materials and methods: The 3-methyl luteoline, kaempferol, resveratrol, myricetin, and quercetin flavonoid molecules were studied. Modelling relied on the AHR:ARNT structures obtained from Swiss Model software, for coupling program MOE 2019.01, and to determine the protein-protein interactions (PPI). The Cocomaps (bioComplexes Contact MAPS) servers, and Robetta and Rosetta Backruband were used for determining the mutations of alanine.

Results: The flavonoids studied associated with contact interfaces at the bHLH, PAS-A domain level and the bHLH/PAS-A and PAS-A/PAS-B of AHR interfaces, and they can undergo an antagonistic behavior due to the interactions at the contact surface level to block or modulate the protein-protein interactions between AHR and ARNT.

Conclusions: The five flavonoids can interact at different AHR superficial interfaces to modulate the formation of the functional heterodimer, acting as antagonist agents. The order of occurrence probability of these actions is higher with 3-methyl luteoline, kaempferol, resveratrol, and lower with myricetin, and quercetin. Feed supplementation using foliage rich in these flavonoids might improve animal health and production.

Keywords: Animal nutrition, Aryl hydrocarbon receptor, flavonoids, breeding, transcription factors (*Source: DeCS*)

Recibido: 21/11/2022

Aceptado: 8/12/2022

INTRODUCCIÓN

El concepto “Una sola salud” (en inglés, *One health*) se introdujo a comienzos del año 2000 para poner nombre a una noción conocida desde hace más de un siglo: la salud humana y la sanidad animal son interdependientes y están vinculadas a los ecosistemas en los cuales coexisten. Una Salud está relacionada con la seguridad alimentaria, agricultura sostenible, inocuidad alimentaria, resistencia a los antimicrobianos, nutrición, sanidad animal y vegetal, pesca y medios de vida, entre otros aspectos (Collado, Álvarez y Martínez, 2022).

En correspondencia con lo anterior, la interrelación entre el AHR en la producción y salud animal se debe a la importancia de este receptor para restaurar los daños causados por xenobióticos. Por otro lado, también incluyen aquellos daños que pueden deberse a patógenos o a dietas indebidas en cerdos luego del destete de las crías y precebas porcinas por medio del aumento de la interleucina IL-22, y propiciar el restablecimiento y estabilidad de la microbiota intestinal con el uso de los probióticos para promover respuestas favorables en los indicadores productivos y de salud (Collado, Rodríguez y Barreto, 2022).

Los animales y los humanos están expuestos cada día a multitudes de sustancias químicas en el aire, el agua y los alimentos. Han desarrollado una batería de enzimas y transportadores inducibles debido a la activación de receptores xenobióticos (ej: AHR) que actúan como factores de transcripción para la regulación de sus genes diana que facilitan la biotransformación y eliminación de estos compuestos (Larigot *et al.*, 2018). El receptor de hidrocarburos arilo (AHR) es una proteína antigua y altamente conservada que ha evolucionado durante 600 millones de años y es miembro de la superfamilia de factores de transcripción basic-helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS) y al igual que el translocador nuclear AHR (ARNT) presenta un dominio heterodimérico básico hélice-bucle-hélice-Por-ARNT-Sim (bHLH-PAS). Tiene funciones centrales en el desarrollo y la homeostasis celular, el ritmo circadiano, tiene capacidad para promover o inhibir la proliferación celular, contribuye en los procesos de adhesión, que involucran interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, se ha implicado en procesos reguladores que afectan al sistema inmunitario, la homeostasis del hígado, el desarrollo cardíaco, la cicatrización de heridas, la apoptosis, la promoción de tumores y las enfermedades metabólicas (Schulte *et al.*, 2017; Wright *et al.*, 2017; Larigot *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2021).

La expresión de AHR es esencialmente ubicua en mamíferos consistente con un papel homeostático de amplio espectro, sin embargo, los niveles de expresión varían ampliamente entre tejidos con hígado, timo, pulmón, riñón, bazo y placenta exhibiendo la mayor expresión. Además, la expresión de AHR está regulada por el desarrollo, y la evidencia más reciente indica un papel para el AHR en el proceso de desarrollo que afecta la hematopoyesis, la biología del sistema inmunológico, la diferenciación neural y la arquitectura del hígado (Wright *et al.*, 2017).

Las consecuencias fisiológicas y toxicológicas de los ligandos de AHR están mediadas por la vía de señalización de AHR. El AHR sin ligando se encuentra en el citosol y se asocia con proteínas chaperonas (es decir, Hsp90, p23 y la proteína 1 que interactúa con AHR). Tras la unión del ligando, el AHR se traslada al núcleo, donde el AHR ligado forma un complejo heterodimérico con el translocador nuclear de AHR (ARNT). El heterodímero AHR-ARNT luego se une a los elementos reactivos de dioxinas (DRE) afines e induce la expresión de una variedad de genes diana que median amplias consecuencias fisiológicas desde el metabolismo xenobiótico y la citotoxicidad hasta la función inmunitaria y vascular normal. La activación de AHR tiene un papel antiinflamatorio e inmunorregulador general en la inmunidad innata y adaptativa, tanto en estado estacionario como en escenarios inflamatorios como la autoinmunidad o la infección (Xing *et al.*, 2012; De Juan y Segura, 2021; Collado, Álvarez y Martínez, 2022; Collado, Rodríguez y Barreto, 2022).

Hace ya varios años se conoce que existe una interrelación entre la señalización del factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) con el AHR. Asimismo, existen mecanismos de regulación recíproca entre el AHR y el TGF- $\beta 1$. El AHR juega un rol importante en el desarrollo de la glándula mamaria y se ha observado que su sobreexpresión induce la transformación maligna de las células epiteliales de mama. El TGF- $\beta 1$ se expresa en las células epiteliales a lo largo de todas las fases del desarrollo mamario y regula procesos celulares de proliferación, diferenciación, migración, invasión y apoptosis. La exposición del AHR frente a sustancias agonistas (Collado, Álvarez y Martínez, 2022) aumenta la migración y activa el camino de membrana del AHR, así como las vías canónicas y no canónicas del TGF- $\beta 1$ que podrían estar involucradas en el mecanismo de acción del tóxico, en el caso de exposición a estos agentes. Las concentraciones ambientales de los mismos modulan las vías de señalización del AHR y del TGF- $\beta 1$. Esto podría contribuir a las alteraciones observadas en la morfogénesis mamaria normal y a exacerbar un fenotipo promigratorio, tanto en las células epiteliales normales como en las células neoplásicas, generando un mayor grado de malignidad (Miret, 2018).

Los polifenoles, que se componen en su estructura química por la presencia de anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilos. En esta clasificación se agrupan más de 8000 compuestos que se subdividen, en varios grupos, donde los más importantes son los ácidos fenólicos, los flavonoides, los estilbenos y los lignanos (Maury *et al.*, 2020).

Los flavonoides son moduladores de la actividad del AHR (Desmet *et al.*, 2021) que protegen contra una variedad de efectos dependientes de AHR (ej: cáncer, colitis), y por características estructurales mencionadas pueden interactuar y unirse a diversos aminoácidos presentes en la estructura proteica del AHR. Por lo que, debido a esto, se procedió a determinar por medio del acoplamiento molecular la unión de cinco flavonoides con el AHR, para bloquear a nivel de las interacciones entre proteínas (AHR y ARNT), la formación del heterodímero funcional y modular sus actividades celulares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el modelado molecular fueron seleccionados los siguientes flavonoides: 3-Metilleuteolina (3-Methyluteolin), Kaempferol, Resveratrol, Miricetina (Myricetin) y Quercetina (Quercetin). Entre paréntesis se escriben los nombres en inglés.

Acoplamiento molecular: se utilizó la estructura de los flavonoides mencionados para el modelado, y un modelo obtenido por SwissModel Web Server del receptor AHR y de su complejo heterodímero con ARNT utilizando como estructura cristalina de ARNT (PDB: 4zp4) y la secuencia de AHR como molde. Para la visualización del modelado molecular, presentación de complejos, poses e interacciones se utilizó el programa MOE 2019.01. Se utilizó el programa servidor Cocomaps (bioCOMplexes Contact MAPS) para la determinación de contactos atómicos ($\leq 6 \text{ \AA}$) entre interfases proteicas del AHR: ARNT (Vangone *et al.*, 2011). Los residuos de aminoácidos importantes para la interacción proteína-proteína (IPP), así como la flexibilidad de las mutaciones de alanina, se determinaron con los servidores web Robetta y Rosetta Backrub acordes a los protocolos de estos programas. Se consideró que los residuos eran importantes cuando el $\Delta\Delta G_{\text{unión}}$ previsto era mayor o igual a $1,0 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Kortemme y Baker, 2002; Kortemme, Kim, y Baker, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La formación del heterodímeros AHR: ARNT al ser activado por un ligando (agonista) ocurre en el dominio PAS-B del AHR. La **figura 1** ilustra el modelo de la arquitectura estructural (3D) de interacción obtenido por SwissModel para los dominios de AHR y su unión al partner pleiotropico ARNT. Las interferencias sobre las IPP que se establecen por parte de cada monómero (AHR y ARNT), son importantes para modular la formación del heterodímero funcional.

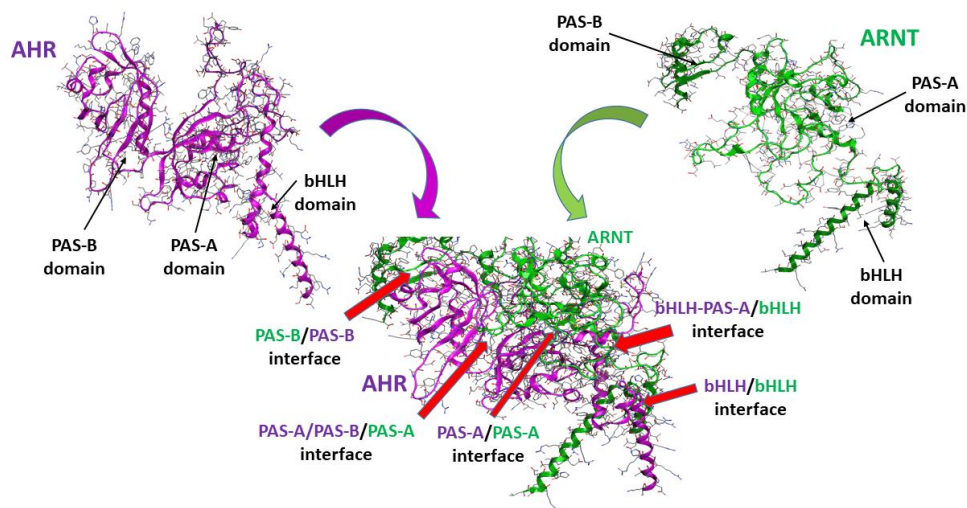


Fig. 1. Arquitectura de la interacción a nivel de los dominios estructurales relacionados con el proceso de dimerización entre AHR y ARNT para la formación del heterodímero funcional AHR: ARNT. Color magenta: AHR. Color verde: ARNT.

Los cinco flavonoides estudiados por modelación molecular a nivel de la superficie del AHR se unen a las interfaces de contacto a nivel de los dominios bHLH, PAS-A y de las interfaces bHLH/PAS-A y PAS-A/PAS-B (**Figura 2**). Por lo que estos compuestos pueden presentar un determinado comportamiento antagonista por interacciones a nivel de las superficies de contacto para bloquear las IPP entre el AHR y ARNT.

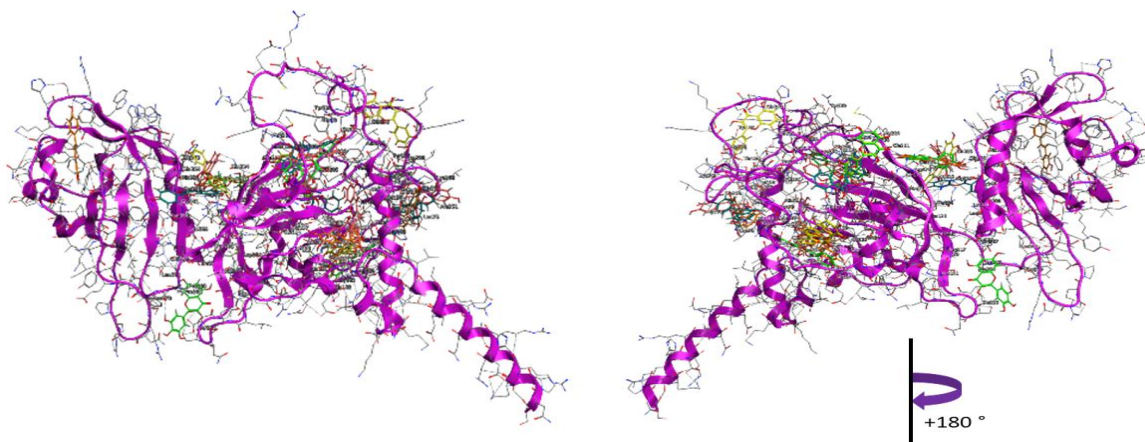


Fig. 2. Representación esquemática de la unión de cinco flavonoides en AHR (AHR SwissModel). Color magenta.

Los cinco flavonoides presentan diferentes capacidades de modular las interacciones a nivel del AHR con el ARNT para formar el heterodímero funcional AHR: ARNT. El orden de interferencia es el siguiente: 3-Methylfluteolin, Kaempferol, Resveratrol, Myricetin y Quercetin. Esto está en correspondencia con lo reportado donde los cuatro primeros compuestos como antagonistas de la actividad del AHR, y la Quercetin como agonista/ antagonista (**Figura 3**) (Zhang, Qin y Safe, 2003).

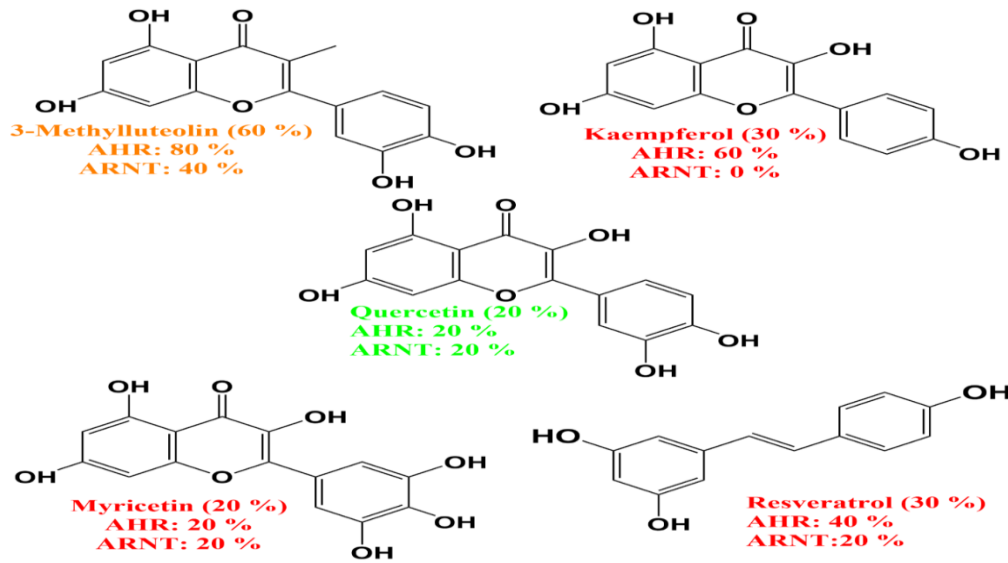


Fig. 3. Estructuras de los cinco flavonoides moduladores de la actividad de AHR. Porcentajes de interferencia de la formación del heterodímero funcional AHR: ARNT y a nivel de los monómeros AHR y ARNT.

El análisis estructural de los cuatro flavonoles se presenta en la tabla 1, y muestra las variaciones que presentan estas estructuras químicas en su modo de unión/interacción con los monómeros AHR y ARNT de forma general. El flavonol de mejor actividad antagonista para bloquear el complejo del heterodímero AHR:ARNT, fue la 3-Methylfluteolin, que constituye la referencia de comparación para los otros tres flavonoles.

Tabla 1. Análisis estructural de los flavonoles antagonistas a nivel de las IPP para la formación del heterodímero AHR: ARNT.

Flavonoles	R ₃	R ₅	R ₇	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}	Unión AHR	Unión ARNT
3-Methylfluteolin	CH ₃	OH	OH	OH	OH	H	60 %	40 %
Kaempferol	OH	OH	OH	H	OH	H	60 %	0 % ↓
Quercetin	OH	OH	OH	OH	OH	H	20 % ↓	20 %
Myricetin	OH	OH	OH	OH	OH	OH	20 %	20 %

El análisis de la Relación Estructura Actividad (REA) de estos compuestos antagonistas es importante para caracterizar su modo de unión con el receptor. Para establecer interacciones a nivel de la superficie de AHR, los flavonoles tienen que presentar un grupo hidroxilo (OH) en las posiciones R₅, R₇ y R_{3'} del anillo del flavonoide. La sustitución de un grupo metilo (CH₃) por un

grupo hidroxilo (OH) en la posición R₃ del anillo del flavonoide, disminuye las actividades sobre AHR, por lo que de forma general la Quercetin es menos activa que la 3-Methylfluteolin. La sustitución de un grupo hidroxilo (OH) por un átomo de hidrogeno (H) en la posición R_{3'} del anillo del flavonoide, disminuye la actividad sobre el ARNT, con lo que se puede obtener un flavonoide antagonista puro Anti-AHR, y así el Kaempferol es menos activo que el Quercetin. Por el contrario, la incorporación de un grupo hidroxilo (OH) en la posición R_{5'} del anillo del flavonoide, no afecta la unión a cada monómero. De forma similar, para establecer interacciones a nivel de la superficie de ARNT, los flavonoles tienen que presentar un grupo hidroxilo (OH) en las posiciones R₅, R₇, R₃ y R_{4'} del anillo del flavonoide.

La Quercetina presenta una posible interacción a nivel de la interface PAS-A/PAS-B de AHR por lo que es lógico de esperar que presente una dualidad como agonista/ antagonista ya que para la primera actividad se reporta como unión preferencial a nivel del bolsillo del dominio PAS-B (LBD) (**Figura 4**). Los otros cuatro flavonoides se han descrito como antagonistas del AHR. Como se aprecia en la **figura 4**, estos pueden de forma específica unirse a las interfaces bHLH/bHLH, bHLH-PAS-A, PAS-A/PAS-A y PAS-A/PAS-B de AHR e interferir con la formación del heterodímero AHR: ARNT a nivel del dominio de estas proteínas relacionado con el proceso de dimerización.

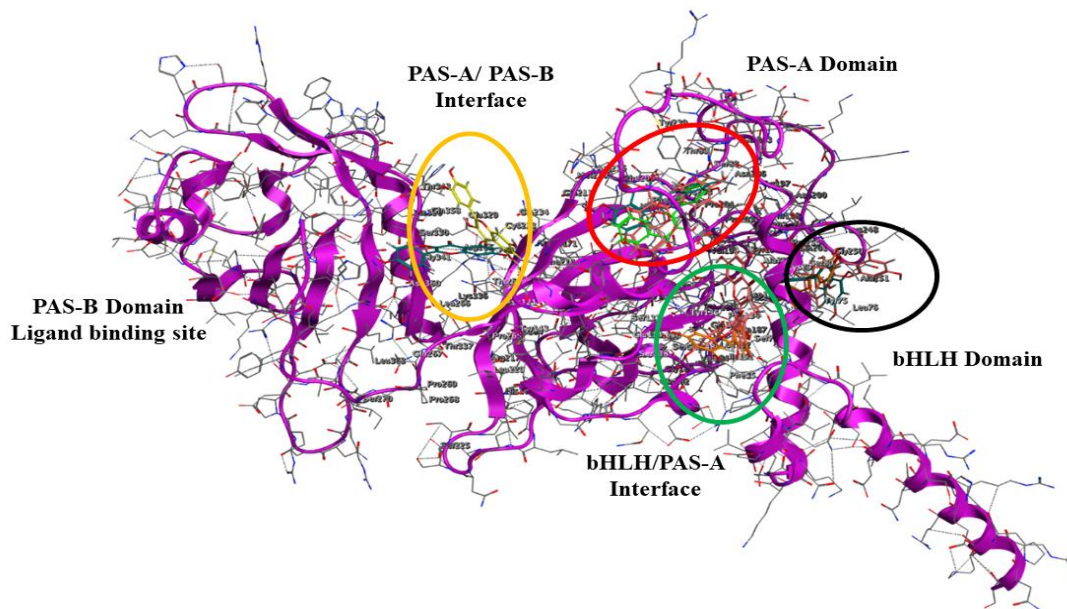


Figura 4. Flavonoides activos que interfieren las IPP de AHR con ARNT a nivel dominio bHLH de AHR. Interfaces bHLH/bHLH (círculo negro), bHLH-PAS-A (círculo verde), PAS-A/PAS-A (círculo rojo) y PAS-A/PAS-B (círculo amarillo).

A nivel de la inteface bHLH en el dominio bHLH de AHR (**Figura 5**) se unen tres flavonoides a través de interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrogeno, por lo que pueden interferir con la formación del heterodímero por provocar impedimentos estéricos para la unión del partner ARNT.

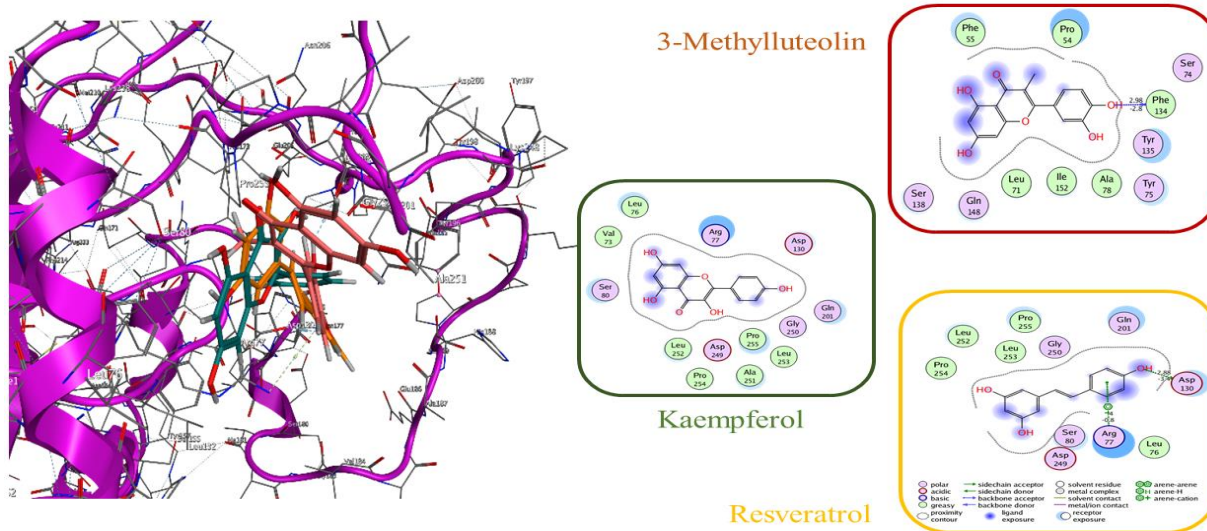


Fig. 5. Flavonoides activos que interfieren las IPP de AHR con ARNT a nivel dominio bHLH/bHLH de AHR. Methylluteolin (rosado), Kaempferol (verde olivo), Resveratrol (anaranjado). AHR (magenta).

En la interface interna formada bHLH/PAS-A formada por los dominios bHLH y PAS-A de AHR se unen solo dos flavonoides de los estudiados, se unen mediante enlaces de hidrogeno Methylluteolin y Resveratrol (**Figura 6**).

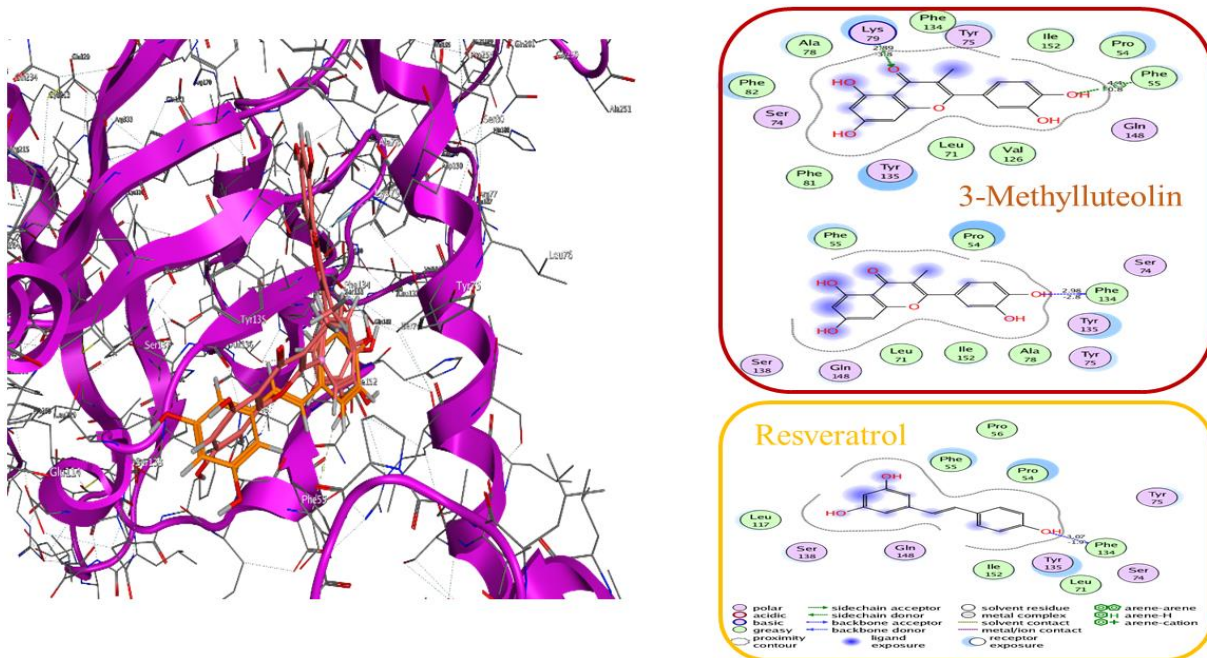


Fig. 6. Flavonoides activos que interfieren las IPP de AHR con ARNT a nivel de la interface bHLH/PAS-A de AHR. Methylluteolin (rosado), Resveratrol (anaranjado). AHR (magenta).

El Resveratrol (3,4',5-trihidroxi-trans-estilbeno) es un polifenol natural que se encuentra comúnmente en la piel de uvas, posee actividad antioxidante y propiedades de captador de

radicales libres. Se han informado muchos mecanismos de acción independientes del eje AHR-CYP1A1 para el el mismo (antagonista no selectivo de AHR). Aunque inhibe la vía adaptativa de AHR, también permite su localización nuclear y la unión a elementos alternativos de respuesta a xenobióticos. La activación de esta vía alternativa de AHR aumenta otro conjunto de genes asociados con antiinflamatorios y propiedades antioxidantes. Además, el Resveratrol también se ha descrito como un inhibidor débil de CYP1A1 y protector de los efectos tóxicos de contaminantes ambientales que son activadores de AHR en pulmón, timo, testículo, próstata, y páncreas (Coelho *et al.*, 2022). Por otro lado, a nivel del dominio estructural PAS-A pueden afectar las IPP los flavonoides 3-Methyluteolin, Kaempferol y Myricetin (**Figura 7**).

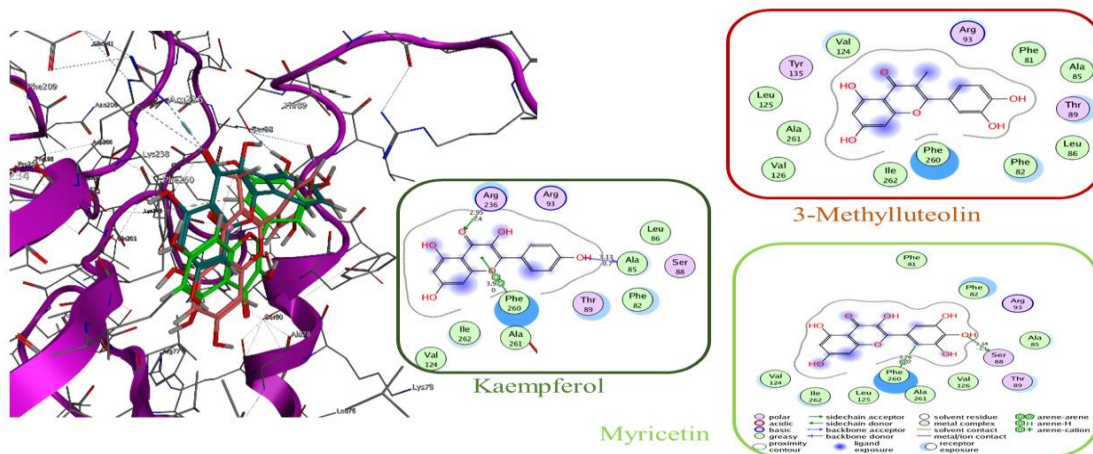


Fig. 7. Flavonoides activos que interfieren las IPP de AHR con ARNT a nivel de la interfase PAS-A de AHR. Methyluteolin (rosado), Kaempferol (verde olivo), Myricetin (verde). AHR (magenta).

La interfase formada entre los dominios PAS-A y PAS-B de AHR es otro sitio de interferencia de los flavonoides para la formación del heterodímero AHR: ARNT. A este nivel los flavonoides Quercetin y Kaempferol pueden afectar las IPP **Figura 8**). En el primer caso, se describe como modulador agonista/antagonista de la actividad de AHR, por sus diferentes comportamientos en dependencia del tipo de célula y de la concentración (Ashida *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2018; Gasaly, Riveros y Gotteland, 2020; Desmet *et al.*, 2021; Han *et al.*, 2021). En este caso, también contribuye su unión preferencial al dominio de unión del ligando (LBD), mientras que aquí proponemos que su actividad antagonista puede deberse a IPP a nivel de superficies, al igual que para Kaempferol y los otros flavonoides ilustrados previamente (Zhang, Qin y Safe, 2003).

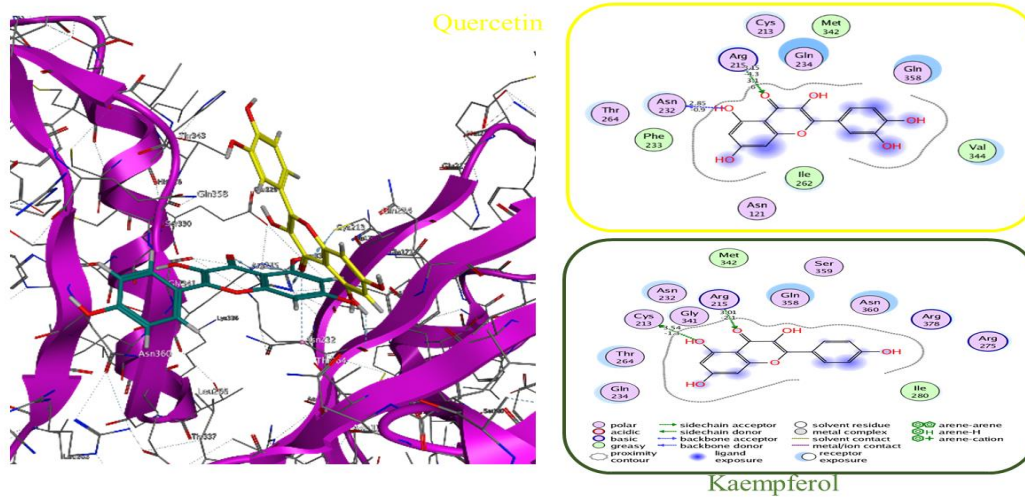


Fig. 8. Flavonoides activos que interfieren las IPP de AHR con ARNT a nivel de la interface PAS-A/PAS-B de AHR. Quercetin (amarillo), Kaempferol (verde olivo), Myricetin (verde). AHR (magenta).

Los flavonoides son ligandos de AHR que han demostrado tener efectos terapéuticos en diversas enfermedades (Park *et al.*, 2019; Bungsu *et al.*, 2021). Pero aún se necesitan más estudios sobre los mecanismos moleculares exactos de acción a través de la señalización de AHR para descubrir sus roles potenciales como modulador inmunológico (Bungsu *et al.*, 2021) y su participación en procesos fisiológicos y patológicos. Estos elementos se presentan como limitaciones para arribar a resultados concluyentes. No obstante, hay evidencia de que los flavonoides son moduladores selectivos de AHR que exhiben sus actividades agonistas y antagonistas y diferentes potencias en forma específica de tejido/órgano/especie. Se ha cuestionado la definición de “agonista” para ligandos que activan AHR, y se propone “modulador” como un término más apropiado sobre la base de lo anteriormente mencionado (Dolciami *et al.*, 2020) ya que es difícil predecir su selectividad agonista/antagonista (Bungsu *et al.*, 2021; Desmet *et al.*, 2021).

Debido a que las vías de señalización de TGF- β 1 están interrelacionadas con el AHR, tienen dianas comunes como la proteína retinoblastoma y el factor E2F, que regulan procesos celulares como el ciclo celular, la apoptosis, la TEM y la diferenciación de las células Treg y TH17 (Miret, 2018). Cuando se activa el AHR por la presencia de algún agente tóxico, se ha descrito que a dosis altas (5 μ M), el tóxico estimula la vía nuclear del AHR y, en consecuencia, no solo se reduce la motilidad celular, sino que induce un arresto del ciclo celular (Miret, 2018).

Los modelos de ratones transgénicos y el uso de potentes ligandos AHR han sido útiles para comprender si las alteraciones de la función AHR afectan el sistema reproductor femenino. El papel intrínseco del AHR en el sistema reproductor femenino está relacionado con las siguientes funciones: i) regulación de la función ovárica mediante el control del número y crecimiento de los folículos antrales, como bien la capacidad de producir esteroides y alcanzar la ovulación; ii) proporcionar un ambiente óptimo para la fertilización, nutrir el embrión y mantener el embarazo; iii) regular la fertilidad; y iv) controlar la senescencia reproductiva. Sin embargo, se desconoce si

AHR participa en el desarrollo embrionario del útero y los oviductos. También se desconoce si la participación de la AHR en la regulación de la senescencia reproductiva está directamente causada por la vía AHR o si la vía AHR modifica genes relacionados con la longevidad; si se necesita una combinación de activación y eliminación de la vía de señalización AHR para regular las funciones del sistema reproductor femenino; y los ligandos endógenos que activan la vía de señalización de AHR en el sistema reproductor femenino. Por lo tanto, se requieren estudios adicionales para dilucidar los complejos mecanismos por los cuales AHR regula la función reproductiva femenina. Esto facilitará el establecimiento de medidas de prevención/tratamiento de trastornos reproductivos como la infertilidad, los abortos y la reducción o ausencia de la vida reproductiva (Hernandez-Ochoa *et al.*, 2009).

Hay evidencias experimentales de que la proteína AHR se encuentra en todas las células ováricas obtenidas durante ambas fases del ciclo estral porcino, y sobreexpresada en células de la granulosa aisladas de folículos preovulatorios en comparación con todos los tipos de células restantes (Hernandez-Ochoa *et al.*, 2009).

Se ha observado que el AHR y ARNT están presentes en las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos medianos y pre ovulatorios, así como en células luteales de cerdas, ello sugiere un papel de AHR en la regulación de la esteroidogénesis ovárica, el desarrollo folicular y la formación y mantenimiento del cuerpo lúteo en cerdas (Jablonska y Ciereszko, 2013). En otro estudio, Pocar *et al.* (2020) reportaron que la inhibición de la actividad AHR estuvo asociada con la reducción de la capacidad de los ovocitos para progresar en la reanudación de la meiosis. Por el contrario, la exposición al antagonista de AHR Resveratrol redujo tanto la expresión de CYP1A1 como la capacidad de maduración de los ovocitos, sin afectar la señalización de ERK1/2.

Por otro lado, la relación entre el AHR y los trastornos hormonales fueron estudiados en un trabajo reciente que tuvo como objetivo investigar cómo la relación entre el estrés del retículo endoplásmico en las células de la granulosa del ovario y el AHR podría contribuir al síndrome de ovario poliquístico (SOP). Usando un modelo murino de PCOS inducido por dehidroepiandrosterona (DHEA), no observaron ciclicidad en el ciclo estral y alteración en la morfología ovárica. La administración subcutánea de CH-223191 (antagonistas de AHR) (10 mg/kg) restauró la pérdida de ciclicidad y morfología ovárica con una disminución de los folículos antrales atrésicos, lo que ocurrió simultáneamente con una regulación a la baja en el eje AHR-CYP1B1 en las células de la granulosa (Coelho *et al.*, 2022).

La familia del TGF- β tiene un profundo impacto en el sistema reproductor de varios organismos, en los humanos se relaciona con la función reproductiva femenina normal durante el embarazo y en diversas patologías ginecológicas. En el mamífero adulto, las proteínas relacionadas con TGF- β gobiernan el crecimiento y diferenciación de células somáticas y germinales dentro de las gónadas. Además, los ligandos de la familia TGF- β están íntimamente implicados en el control de la ovulación y la fertilización, y en el establecimiento y mantenimiento del embarazo de la mujer. Varios factores de crecimiento relacionados con TGF- β también sirven como hormonas

endocrinas para integrar el estado reproductivo de la gónada al estado fisiológico del organismo. Los estudios traslacionales que utilizan tejidos humanos, células y estudios de asociación de todo el genoma también implican la señalización anormal de TGF- β en enfermedades reproductivas femeninas, como la endometriosis, los fibromas uterinos y la preeclampsia en las mujeres (Monsivais, Matzuk y Pangas, 2017; Larigot *et al.*, 2018).

Posibles implicaciones del AHR en la salud de la hembra, la reproducción animal, y el rendimiento del rebaño

En los últimos años, se ha encontrado una multiplicidad de funciones importantes de AHR, superando su papel original como un sensor xenobiótico y regulador de la desintoxicación xenobiótica. De hecho, AHR se ha confirmado como una señal importante molécula que regula y mantiene la homeostasis en diferentes células, tejidos y órganos. Nuevos datos destacan la activación del eje AHR-CYP1A1 en los mecanismos de la enfermedad, lo que justifica el valor putativo de su bloqueo terapéutico. De este modo, es oportuno investigar y caracterizar mejor las propiedades farmacológicas de los bloqueadores del eje AHR-CYP1A1, y por lo tanto los bloqueadores de AHR-CYP1A1 podrían ser útiles en el tratamiento de enfermedades crónicas (Coelho *et al.*, 2022).

La exposición a contaminantes puede afectar negativamente la función reproductiva de los animales y que es probable que los alimentos sean la vía de exposición más importante para muchas o la mayoría de las especies, en particular para aquellas que se encuentran en la parte superior de la cadena alimentaria. Sin embargo, la evaluación del riesgo se complica por el hecho de que en el "mundo real" los alimentos contienen muchas clases diferentes de contaminantes, cada uno en concentraciones bajas y variables, y la exposición a ellos se produce a lo largo de la vida, incluso durante las etapas de desarrollo que son particularmente sensibles a sus efectos. En resumen, los contaminantes alimentarios representan un factor de riesgo importante para la reproducción, pero la cuantificación precisa de estos riesgos para las personas es extremadamente difícil con los conocimientos actuales (Rhind, 2008; Collado, Álvarez y Martínez, 2022).

El AHR desempeña un papel importante en la fisiopatología de la reproducción a través de la vía de señalización AHR/ARNT (Zao *et al.*, 2020). Cuando el AHR está sobreexpresado, puede afectar directa o indirectamente las vías de señalización y las proteínas asociadas a la fisiología de la reproducción. En la práctica veterinaria los problemas reproductivos son comunes y provocan cuantiosas pérdidas económicas, por ejemplo, las metritis disminuyen la producción de leche, la reproducción y la supervivencia de las hembras en el rebaño (Pérez-Báez *et al.*, 2021), igualmente la mastitis (Puerto *et al.*, 2021) en el ganado lechero. Por ello, de acuerdo con Dallago *et al.* (2021), la reducción en el desecho involuntario disminuiría los costos de la salud y aumentaría la rentabilidad de las vacas en su vida productiva, así como la calidad de vida de los animales y contribuiría a una industria láctea más sostenible mientras se optimiza la eficiencia de los productores lecheros en el uso de los recursos.

Factibilidad de tratamiento con suplementación nutricional basada en metabolitos activos funcionales de tipo flavonoide

Los polifenoles son compuestos vegetales naturales y constituyen los antioxidantes más abundantes en la dieta humana (Ray y Mukherjee, 2021). En general, los antioxidantes se definen como sustancias capaces de reducir y evitar la oxidación de un sustrato (proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN) a bajas concentraciones, y están presentes en las verduras, frutas y cereales que se consumen habitualmente como dietas naturales, porque son seguros y brindan una gran cantidad de beneficios para la salud (Yordi et al., 2012; Maury *et al.*, 2020). Dado que el tracto gastrointestinal es el órgano principal que degrada a los diferentes componentes presentes en el alimento animal, la dieta puede considerarse como uno de los factores esenciales en la funcionalidad, integridad y composición de la microbiota intestinal. Muchos polifenoles no se absorben y pueden acumularse en el intestino grueso, donde la microbiota intestinal se metaboliza más ampliamente. Al asumir roles primarios para promover el bienestar del huésped, este entorno de salud intestinal se presenta al efecto de influencias externas, incluidos los patrones dietéticos (Ray y Mukherjee, 2021).

Alrededor del 400 a. C., Hipócrates dijo que “la muerte se asienta en los intestinos” y que “la mala digestión es la raíz de todos los males”, lo que indica el papel esencial del intestino humano en su salud y enfermedad, con lo que los fenoles y sus metabolitos tienen una influencia positiva en la salud intestinal al promover la producción de microbiota beneficiosa y controlar la propagación de bacterias patógenas (Ray y Mukherjee, 2021). La evidencia acumulada indica que la nutrición puede modular el sistema inmunológico a través de metabolitos (ej: derivados del triptófano), ya sea producidos por la digestión del huésped o por el metabolismo de la microbiota intestinal (MI) (Wheeler, Rothhammer y Quintana, 2017; Zhang, *et al.*, 2020; De Juan y Segura, 2021; Modoux *et al.*, 2021; Collado, Rodríguez y Barreto, 2022).

Los flavonoides, se encuentran en los vegetales en formas glicosiladas. Aunque algunos de ellos puedan ser deglicosilados por la lactasa intestinal, la mayoría lo son por bacterias del colon. Los diholosidos y oligosidos liberados por este proceso son rápidamente fermentados, generando ácidos grasos volátiles (AGVs), mientras que la fracción aglicona también es metabolizada por la MI, resultando en la formación de diversos metabolitos (Gasaly, Riveros y Gotteland, 2020).

Los flavonoides son una de las clases principales de ligandos AHR derivados de la dieta. Son una gran clase de metabolitos secundarios polifenólicos que se distribuyen ampliamente en frutas y verduras. La Quercetina, la Taxifolina y la Robinetina actúan como agonistas y pueden activar el AHR, mientras que la Luteolina, actúa como antagonista del AHR (Ashida *et al.*, 2000; Zhang, Qin y Safe, 2003; Jin *et al.*, 2018; Gasaly, Riveros y Gotteland, 2020; Han *et al.*, 2021). Por lo que los resultados de la modelación molecular coinciden con lo reportado, en este caso que la Quercetina actúa como antagonista parcial, y el derivado de la Luteolina (3-Methylfluteolin) actué como antagonista (Zhang, Qin y Safe, 2003), en estos casos por mediación de un mecanismo de acción a nivel de las diferentes interfaces superficiales que especificadas para cada compuesto y monómero.

Por otro lado, la presencia de flavonoides en la leche bovina puede aportar una fuente de antioxidantes naturales para el consumidor, lo cual constituye un efecto benéfico para la

prevención de algunos procesos patológicos mediados por radicales libres. Se ha propuesto para la suplementación nutricional, incluir forrajes que contengan sustancias antioxidantes como los flavonoides en la ración de las hembras bovinas en producción, que, siendo biodisponibles en la especie, también se excretan en la leche en forma activa y en concentraciones equivalentes a las plasmáticas, con lo que también aportan una protección antioxidante frente al posible enranciamiento de la leche (Cruz Carrillo y Lizarazo, 2016).

El tratamiento con suplementación nutricional basado en metabolitos activos funcionales se evidencia con los resultados publicados, ya que al comparar el contenido de polifenoles totales en la leche de cabras a las que se les suministró *Sulla coronarium* L o heno de cebada, se observó un comportamiento similar para los polifenoles libres en la leche pero en el primer grupo el contenido de polifenoles totales fue mayor, proporcionando esta planta un valor adicional en términos de estatus oxidativo (Zapata y Mellado, 2021). Esto evidencia la utilidad práctica de la suplementación de follajes ricos en polifenoles para la producción de leche con mejor calidad.

CONCLUSIONES

Los cinco flavonoides estudiados interactúan a nivel de diferentes interfaces superficiales con el receptor AHR para bloquear o modular la formación y las actividades celulares del heterodímero funcional AHR: ARNT, acorde a los resultados del estudio de acoplamiento molecular. El orden de probabilidad para estas acciones es mayor para 3-Methylleuteolin, Kaemferol, Resveratrol, y menor con Myricetin y Quercetin. La Relación Estructura Actividad (REA) para que estos compuestos sean antagonistas a nivel de la superficie de AHR, los flavonoles tienen que presentar un grupo hidroxilo (OH) en las posiciones R₅, R₇ y R_{3'} del anillo del flavonoide, y para el ARNT, los flavonoles tienen que presentar un grupo hidroxilo (OH) en las posiciones en las mismas posiciones anteriores e incluyendo la posición R_{4'} del anillo del flavonoide. La suplementación de la alimentación con follajes ricos en estos flavonoides podría mejorar la salud y la producción animal, acorde a los resultados de la modelación molecular.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a todos los colaboradores de esta investigación que ha sido parcialmente financiada por la Cooperación Belga al Desarrollo, a través del VLIR-UOS (Consejo de Universidades Flamencas), a través del Proyecto TEAM con referencia CU2017TEA433A102 y CU2019TEA482A102.

REFERENCIAS

- Ashida, H., Fukuda, I., Yamashita, T., & Kanazawa, K. (2000). Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin. *FEBS Letters*, 476(3), 213-217. DOI: [10.1016/s0014-5793\(00\)01730-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01730-0)
- Bungsu, I., Kifli, N., Ahmad, S. R., Ghani, H., & Cunningham, A. C. (2021). Herbal Plants: the Role of AhR in Mediating Immunomodulation. *Frontiers in Immunology*, 2491.
- Coelho, N. R., Pimpão, A. B., Correia, M. J., Rodrigues, T. C., Monteiro, E. C., Morello, J., & Pereira, S. A. (2022). Pharmacological blockage of the AHR-CYP1A1 axis: a call for in vivo evidence. *Journal of Molecular Medicine*, 100(2), 215-243. DOI: [10.1007/s00109-021-02163-2](https://doi.org/10.1007/s00109-021-02163-2)
- Collado García, O. G., Álvarez Gil, M. D. J., & Martínez Sáez, S. J. (2022). Agonistas del receptor de hidrocarburos de arilo como contaminantes en alimentos para la producción animal. *Revista de Producción Animal*, 34(1), 1-15. <https://revistas.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e4044>
- Collado García, O. G., Rodríguez Torrens, H. D. L. C., & Barreto Argilagos, G. (2022). Papel de las interacciones entre el receptor de hidrocarburos de arilo y la microbiota en la salud de las crías y precebas porcinas. *Revista de Producción Animal*, 34(1), 87-102. <https://revistas.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e4156>
- Cruz Carrillo, A., & Lizarazo Cely, C. S. (2016). Efectos de la inclusión de dietas ricas en flavonoides en la calidad de la leche bovina. *Revista de Medicina Veterinaria*, 1(31), 137-150. DOI: <https://doi.org/10.19052/mv.3716>
- De Juan, A., & Segura, E. (2021). Modulation of immune responses by nutritional ligands of aryl hydrocarbon receptor. *Frontiers in Immunology*, 1948. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.645168>
- Desmet, N. M., Dhusia, K., Qi, W., Doseff, A. I., Bhattacharya, S., & Gilad, A. A. (2021). Bioengineering of genetically encoded gene promoter repressed by the flavonoid apigenin for constructing intracellular sensor for molecular events. *Biosensors*, 11(5), 137. <https://doi.org/10.3390/bios11050137>
- Dolciami, D., Ballarotto, M., Gargaro, M., López-Cara, L. C., Fallarino, F., & Macchiarulo, A. (2020). Targeting Aryl hydrocarbon receptor for next-generation immunotherapies: Selective modulators (SAhRMs) versus rapidly metabolized ligands (RMAhRLs). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 185, 111842. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111842>
- Gasaly, N., Riveros, K., & Gotteland, M. (2020). Fitoquímicos: una nueva clase de prebióticos. *Revista chilena de nutrición*, 47(2), 317-327. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182020000200317>
- Han, H., Safe, S., Jayaraman, A., & Chapkin, R. S. (2021). Diet–Host–Microbiota Interactions Shape Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production to Modulate Intestinal

- Homeostasis. *Annual review of nutrition*, 41, 455. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-043020-090050>
- Hernandez-Ochoa, I., Karman, B.N., & Flaws, J.A. (2009). The role of the aryl hydrocarbon receptor in the female reproductive system. *Biochem Pharmacol* 77, 547–559. DOI: [10.1146/annurev-nutr-043020-090050](https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-043020-090050)
- Jablonska, O., & Ciereszko, R. E. (2013). The expression of aryl hydrocarbon receptor in porcine ovarian cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(5), 710-716. <https://doi.org/10.1111/rda.12145>
- Jin, U. H., Park, H., Li, X., Davidson, L. A., Allred, C., Patil, B., ... & Safe, S. (2018). Structure-dependent modulation of aryl hydrocarbon receptor-mediated activities by flavonoids. *Toxicological Sciences*, 164(1), 205-217. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy075>
- Kortemme, T., & Baker, D. (2002). A simple physical model for binding energy hot spots in protein–protein complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), 14116-14121. <https://doi.org/10.1073/pnas.202485799>
- Kortemme, T., Kim, D. E., & Baker, D. (2004). Computational alanine scanning of protein–protein interfaces. *Science's STKE*, 2004(219), pl2-pl2. DOI: [10.1126/stke.2192004pl2](https://doi.org/10.1126/stke.2192004pl2)
- Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., & Coumoul, X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie open*, 7, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.biopen.2018.05.001>
- Maury, G., Méndez Rodríguez, D., Hendrix, S., Escalona Arranz, J. C., Fung Boix, Y., Pacheco, A. O., ... & Cuyper, A. (2020). Antioxidants in plants: A valorization potential emphasizing the need for the conservation of plant biodiversity in Cuba. *Antioxidants*, 9(11), 1048. DOI: [10.3390/antiox9111048](https://doi.org/10.3390/antiox9111048)
- Miret, N. V. (2018). *Acción de disruptores endocrinos en cáncer de mama. Rol del factor de crecimiento transformante- β 1 y del receptor de hidrocarburos aromáticos* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales). https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n6288_Miret.pdf
- Modoux, M., Rolhion, N., Mani, S., & Sokol, H. (2021). Tryptophan metabolism as a pharmacological target. *Trends in Pharmacological Sciences*, 42(1), 60-73. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.11.006>
- Monsivais, D., Matzuk, M. M., & Pangas, S. A. (2017). The TGF- β family in the reproductive tract. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(10), a022251. DOI: [10.1101/cshperspect.a022251](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022251)
- Park, H., Jin, U. H., Orr, A. A., Echegaray, S. P., Davidson, L. A., Allred, C. D., ... & Safe, S. (2019). Isoflavones as Ah Receptor Agonists in Colon-Derived Cell Lines: Structure–Activity Relationships. *Chemical research in toxicology*, 32(11), 2353-2364. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00352>

- Pérez-Báez, J., Silva, T. V., Risco, C. A., Chebel, R. C., Cunha, F., De Vries, A., ... & Galvão, K. N. (2021). The economic cost of metritis in dairy herds. *Journal of Dairy Science*, *104*(3), 3158-3168. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19125>
- Pocar, P., Berrini, A., Di Giancamillo, A., Fischer, B., & Borromeo, V. (2020). Regulation of the aryl hydrocarbon receptor activity in bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: The role of EGFR and post-EGFR ERK1/2 signaling cascade. *Theriogenology*, *156*, 59-69. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.037>
- Puerto, M. A., Shepley, E., Cue, R. I., Warner, D., Dubuc, J., & Vasseur, E. (2021). The hidden cost of disease: I. Impact of the first incidence of mastitis on production and economic indicators of primiparous dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *104*(7), 7932-7943. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19584>
- Ray, S. K., & Mukherjee, S. (2021). Evolving interplay between dietary polyphenols and gut microbiota—An emerging importance in healthcare. *Frontiers in Nutrition*, *8*, 634944. DOI: [10.3389/fnut.2021.634944](https://doi.org/10.3389/fnut.2021.634944)
- Rhind, S. M. (2008). Endocrine Disruptors and Other Food-contaminating Environmental Pollutants as Risk Factors in Animal Reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, *43*, 15-22. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01138.x>
- Schulte, K. W., Green, E., Wilz, A., Platten, M., & Daumke, O. (2017). Structural basis for aryl hydrocarbon receptor-mediated gene activation. *Structure*, *25*(7), 1025-1033. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.05.008>
- Vangone, A., Spinelli, R., Scarano, V., Cavallo, L., & Oliva, R. (2011). COCOMAPS: a web application to analyze and visualize contacts at the interface of biomolecular complexes. *Bioinformatics*, *27*(20), 2915-2916. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr484>
- Wheeler, M. A., Rothhammer, V., & Quintana, F. J. (2017). Control of immune-mediated pathology via the aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(30), 12383-12389. DOI:<https://doi.org/10.1074/jbc.R116.767723>
- Wright, E. J., De Castro, K. P., Joshi, A. D., & Elferink, C. J. (2017). Canonical and non-canonical aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Current Opinion in Toxicology*, *2*, 87-92. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.01.001>
- Xing, Y., Nukaya, M., Satyshur, K. A., Jiang, L., Stanevich, V., Korkmaz, E. N., ... & Bradfield, C. A. (2012). Identification of the Ah-receptor structural determinants for ligand preferences. *Toxicological Sciences*, *129*(1), 86-97. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs194>
- Yordi, E. G., Pérez, E. M., Matos, M. J., & Villares, E. U. (2012). Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. *Nutrition, well-being and health*, *2*, 23-48. <https://library.um.edu.mo/ebooks/b28355507.pdf#page=33>

- Zapata-Campos, C. C., & Mellado-Bosque, M. Á. (2021). La cabra: selección y hábitos de consumo de plantas nativas en agostadero árido. *CienciaUAT*, 15(2), 169-185. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v15i2.1409>
- Zhang, S., Qin, C., & Safe, S. H. (2003). Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environmental health perspectives*, 111(16), 1877-1882. <https://doi.org/10.1289/ehp.6322>
- Zhang, X., Gan, M., Li, J., Li, H., Su, M., Tan, D., ... & Chen, G. (2020). Endogenous indole pyruvate pathway for tryptophan metabolism mediated by IL4I1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(39), 10678-10684. DOI: [10.1021/acs.jafc.0c03735](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03735)
- Zhao, Y., Lin, J., Talukder, M., Zhu, S. Y., Li, M. Z., Wang, H. R., & Li, J. L. (2020). Aryl hydrocarbon receptor as a target for lycopene preventing DEHP-induced spermatogenic disorders. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(15), 4355-4366. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07795>

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

La participación de los autores fue la siguiente: Concepción y diseño de la investigación: OGCG, SJMS, JABV, HDW, EM, PC, redacción del artículo: OGCG, SJMS, JABV, HDW, EM, PC.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses.