



IMPACTE EN LA SALUT DEL CONSUM D'INSECTES A TRAVÉS DE LA SEVA INTERACCIÓ AMB EL TRACTE GASTROINTESTINAL

Helena Segú



La tesi *Impacte en la salut del consum d'insectes a través de la seva interacció amb el tracte gastrointestinal: explorant el paper dels receptors intestinals del gust* ha rebut el premi a la millor tesi escrita en català a la Universitat Rovira i Virgili en l'àmbit de les ciències experimentals i de la salut el 2025.

Els premis duen el nom de Josep M. Pujol i Sanmartín (1947-2012) en homenatge a aquest professor i investigador del Departament de Filologia Catalana de la Universitat. El seu àmbit de recerca es va centrar en l'escriptura tipogràfica, la literatura catalana medieval i el folklore.

IMPACTE EN LA SALUT DEL CONSUM D'INSECTES A TRAVÉS DE LA SEVA INTERACCIÓ AMB EL TRACTE GASTROINTESTINAL

Explorant el paper
dels receptors intestinals del gust

Helena Segú



Tarragona, 2026

PUBLICACIONS DE LA UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Av. Catalunya, 35 · 43002 Tarragona

Tel. 977 558 474 · publicacions@urv.cat

www.publicacions.urv.cat



1a edició: maig de 2026

ISBN (paper): 978-84-1365-270-2

ISBN (PDF): 978-84-1365-271-9

DOI: 10.17345/9788413652719

Dipòsit legal: T 558-2026



Cita el llibre.



Consulta el llibre a la nostra web.



Llibre sota una llicència Creative Commons BY-NC-SA.

Publicacions de la Universitat Rovira i Virgili és membre de la Unión de Editoriales Universitarias Españolas i de la Xarxa Vives, fet que garanteix la difusió i comercialització de les seves publicacions a nivell nacional i internacional.

A l'avi, l'àvia i la mama.

«Que tot està per fer i tot és possible»

Miquel Martí i Pol, *Ara mateix*

Taula

Llista d'abreviatures	11
Agraïments	13
Introducció	17
1. Preàmbul	17
2. Els insectes com a font alternativa de proteïnes	18
2.1 La necessitat de trobar fonts alternatives de proteïnes	18
2.2 L'impacte ambiental de les diferents fonts de proteïna	19
2.3 Consum d'insectes per part dels humans (entomofàgia)	21
2.4 Valor nutricional dels insectes	24
3. El tracte gastrointestinal i la modulació de les seves funcions per als aliments	30
3.1 Anatomia, fisiologia i funció general de l'intestí	30
3.2 Barrera intestinal en salut i malaltia	35
3.3 Receptors del gust	46
Referències	53
Hipòtesi i objectius	77
Part 1	81
Part 2	95
Part 3	111
Discussió general	141
Conclusions	159
Annex.....	161
Abstract	167

Llista d'abreviatures

AA	Aminoàcids
Ag	Antígens
AMP	Pèptids antimicrobians
ATP	Adenosina-5'-trifosfat
BCAA	Aminoàcids de cadena ramificada
PC	Pes corporal
AMPc	Monofosfat cíclic d'adenosina
CAF	Cafeteria Dietètica
CCK	Colecistoquinina
CD	Cèl·lules dendrítiques
DSS	Sulfat de sodi dextran
EAA	Aminoàcid essencial
EFSA	Autoritat Europea de Seguretat Alimentària
FAO	Organització d'Alimentació i Agricultura de les Nacions Unides
GALT	Teixit limfoide associat a l'intestí
GEH	Gas d'efecte hivernacle
GI	Tracte gastrointestinal
GLP-1	Pèptid similar al glucagó 1
GPCR	Receptor acoblat a proteïnes G
HDM	Àcars de la pols domèstica
HFD	Dieta alta en greixos
Ig	Immunoglobulina
IL	Interleucina
ILC	Cèl·lules limfoides innates
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfat
LP	<i>Lamina propria</i>

LPS	Lipopolisacàrids
M	Superfície d'absorció
Cèl·lules M	Cèl·lules microplegables
MAC	Carbohidrats accessibles per la microbiota
MLN	Gangli limfàtic mesentèric
MPO	Mieloperoxidasa
MSG	Glutamat monosòdic
MUC	Mucina
MUFA	Àcids grassos monoinsaturats
OVA	Ovoalbúmina
PUFA	Àcids grassos poliinsaturats
ROS	Espècies reactives d'oxigen
SCFA	Àcids grassos de cadena curta
SCP	Proteïna cel·lular "única"
SFA	Àcids grassos saturats
sIgA	Immunoglobulina secretora A
TASR	Receptor del gust
TGF- β	Factor de creixement β
TJ	Unió estreta
TLR	Receptors de tipus Toll
TNF- α	Factor de necrosi tumoral α
Treg	Limfòcits T reguladors

Agraïments

Primer de tot, m'agradaria agrair a les meves directores, Mayte i Esther, l'oportunitat que em van donar fa tres anys i escaig de formar part del grup MoBioFood, que m'ha ajudat a créixer com a investigadora, i també l'ànim que m'heu ofert en tot moment. He après moltes coses de vosaltres, m'heu guiat i m'heu donat el suport i la confiança que han permès aconseguir aquest resultat. Moltes gràcies per tot.

I would like to thank Jamileh for accepting me to do my international stay in Université Paris Cité. You gave me the opportunity to learn new laboratory techniques and the freedom to carry out the experiments for my thesis. I am very thankful to you for facilitating my stay in Paris. Merci beaucoup!!

També agraeixo a la resta de MoBioFood sèniors, Anna, Montse, Raül i Ximena, el suport durant tot aquest temps i tots els bons moments fora de la feina. I ara, a tots els companys i amics que m'emporto, que heu fet que aquests anys estiguin plens d'experiències i aprenentatges. Gràcies, Carme, Marta i Alba, per haver estat referents per a mi. Sou unes cracs i, tot i que el temps que vam compartir no va ser pas tant, en vaig aprendre molt i vaig poder gaudir molt de vosaltres, tant dins com fora del laboratori. M'enduc molts records de sopars, festes i viatges per sempre.

Ara us toca a vosaltres, Maria i Júlia, que sou les millors amigues que m'emporto d'aquesta etapa. Gràcies, Júlia, per ajudar-me en els meus primers passos al laboratori, fent l'MPO de l'Adrià i aprenent a fer ELISA. Treballar amb tu era molt fàcil i vam congeniar molt ràpid. Va aparèixer la Maria, amb les seves històries sobre Camprodon (l'únic semàfor, el túnel, l'Spar, la Teisa i la ratafia al Casal), i vam forjar una forta amistat que segur que perdurarà. Gràcies, Maria, per tots els moments, per acompanyar-me en la bogeria de treballar dotze hores al dia, carregant deu plaques de PCR, venint dies festius per les meves cèl·lules i ajudant-me tantes i tantes vegades. Són molts els records de les mil hores que hem passat juntes, també fora de la Universitat, al cotxe parlant, mirant futbol, anant a buscar l'Arnau o anant-nos a vacunar. T'ho

agraeix molt. Moltes gràcies a totes dues per ser al meu costat durant aquests anys, per haver vingut a París, pels sopars, vermouths, concerts i viatges, i per tot el que vindrà! Us estimo molt!

Al Florijan, moltes gràcies també per formar part de molts bons moments, per ensenyar-nos Eslovènia i per ser la meua “parella científica”: ho has demostrat perquè sempre has estat al meu costat i sent un bon amic. Gràcies a l'Esther, ara com a amiga, per ajudar-me tant, per tenir converses profundes i cantar *triski-triski-triski* mentre preparem l'article per enviar-lo i pels moments fora de la Universitat que et fan única. Al Zac, Kuskus!!, moltes gràcies for being a good partner and friend as well as the best organiser of trips to Kenya.

A l'Adrià, per ser el meu nòvio i cuidar-me sempre. Perquè, tot i que, com diu l'Esther, ets un ministre, les teves explicacions i dubtes científics (que creen debats interessants, fins i tot en les reunions de grup) et fan ser únic. Estàs inclòs en molts dels millors records que tinc d'aquests anys; per tot això, moltes gràcies!

Mònica i Cèlia, també formeu part de molts d'aquests bons moments i sense vosaltres no hauria estat el mateix. Gràcies, Mònica, per estar disposada a ajudar sempre, per ser tan treballadora, per haver-me donat suport en moments d'estrès màxim i, sobretot, per tenir temes de conversa sempre. Cèlia, tot i que no haguem treballat gaire juntes, sé que ets una crac i que estàs sempre disposada a donar un cop de mà, i fora de la Universitat ha estat un plaer compartir temps amb tu.

A la més nova, Oria, et desitjo el millor i n'estic segura que tot anirà perfecte, perquè has demostrat que ets capaç d'acabar ELISA desmuntats, a les vuit del vespre i plorant. Gràcies també per aquestes bones estones!

Gràcies, Marina, per ser la postdoc referent d'aquests últims mesos, pels consells i per la paciència amb mi.

A tots els estudiants que heu passat pel grup, i especialment als últims amb qui més temps d'estrès he compartit, Margalida, Aritz, Luis i Adrià M., la vostra feina i les ganes d'aprendre ajuden molt, i us agraeixo els moments compartits. També agraeixo haver conegut gent tan maca com la Francesca o la Marie.

I, tot i que no siguis del grup, és com si ho fossis... gràcies, Ari, per aquest anyet, per aportar calma en un despatx de bogeria, per unir-te als *salseos* i pel teu suport.

Els Nutris també heu estat molt importants en tot aquest viatge i no em vull deixar a ningú. A tots, gràcies per uns primers estius de platja i per les nits de festa.

Al Pauli, el més maco del món, gràcies per haver-me ensenyat-me Gèrgal, per tenir a punt sempre una abraçada i un somriure que es contagia, per ser tan dolç i maco.

Gràcies, Rafiki, perquè sempre vols organitzar excursions i partits de futbol i ets un tros de pa i bon amic, malgrat la teua capa de voler ser dur.

Gràcies, Néstor, per haver-me ajudat en tantes coses, per haver-me descobert el mètode de determinació de nitrats que tu i jo sabem realment com es diu, per haver-me

guiat en el final d'aquesta tesi i per ser com ets! No canviïs mai els teus acudits dolents, que ens animen cada dia.

Al Marc, gràcies per haver-nos descobert els millors llocs de Mallorca, per les excursions i vies ferrades; ara seré més lliure i en podrem fer més!

Al Jorge, per la seva passió pel Mallorca i per tots els partits de futbol... hi tornem?

A d'altres que han format part del meu dia a dia durant aquest temps, algunes que ja han marxat, Ivan, Fra i Vero, i d'altres que han començat recentment, Alba i Aina, ha estat un plaer coincidir amb vosaltres.

Niurka i Rosa, moltes gràcies perquè sempre esteu disposades a ajudar i heu estat un pilar molt important perquè les coses surtin bé, he après molt de vosaltres.

Al Jorge, per haver-me ajudat a fer realitat que l'estada fos a París, per ser tan bo, per incloure'm en tants plans i no deixar-me mai sola; gràcies per tot!

Fora de la Universitat, a molts us he d'agrair tot el que feu cada dia per mi. Als amics de sempre, que m'heu fet costat, que m'heu ajudat a esbargir-me en moments més complicats, que va ser amb mi quan us necessitava a París. Per mil excursions, aventures, viatges i la vostra amistat. Gràcies a tots, Blanca, Artur, Júlia, Núria i, especialment, Judit, Àlex i Marc, també pels dies de gimnàs. Que, encara que moltes vegades em queixi i vulgui fer campana, veure-us tant sovint, els moments de cotxe i fer una mica d'esport acompanyada em fa molt feliç.

A la Diana, perquè sempre hi ets, tot i la distància, i per la teva ajuda en el disseny d'aquesta tesi.

A la Gemmix, amb tu vaig començar en aquest món de la ciència i hem compartit tantes coses... Gràcies per aquests anys i, malgrat que vius lluny, per ser tan propera i bona.

A la Velia, o la meva Vèlia, com m'agrada dir, gràcies per ser la meva amiga peruana catalana més bonica i preocupar-te i donar-me suport.

A l'Abel, gràcies per ser el millor i per tot el suport que m'has donat, sense tu no seria el mateix. Us estimo molt!

A la meva família, que és la millor del món. Gràcies a tiets, tietes i als cosins per ser com sou i estimar-me tant. Gràcies, papa, perquè sempre vols el millor per a mi i pels teus consells. Gràcies, àvia, perquè, juntament amb l'avi, sou el meu referent a la vida, per cuidar-me sempre i per fer-me més fàcils els dies. A l'Eduard, perquè em treu de polleuera però és al meu costat cada dia. I a la mama, que ho ha fet sempre tot per nosaltres. Gràcies per cuidar-nos cada dia, per deixar-me preparat el dinar cada matí, per enviar-me menjar fins i tot quan era a París, per animar-me cada dia i ajudar-me en tot, gràcies per fer la súper portada d'aquesta tesi. Ets la millor, mameta. Us estimo molt a tots.

Introducció

1. Preàmbul

La recerca de fonts proteiques sostenibles que no només contribueixin a reduir l'impacte ambiental de la producció d'aliments, sinó que també puguin beneficiar la nostra salut, és un objectiu global. En aquest context, els insectes s'han postulat com una font proteica d'alta qualitat, ja que aporten altres nutrients beneficiosos a part de les proteïnes i, a més, la seva producció es considera respectuosa amb el medi ambient.¹ Així doncs, suposen una bona alternativa per a les fonts convencionals de proteïnes, però hi ha algunes barreres com l'acceptació social. En aquest sentit, altres estudis que demostrin els efectes del consum d'insectes sobre la salut, i que permetin elucidar-ne els beneficis, són crucials per augmentar-ne l'acceptació.²

Els components dietètics són un dels factors més importants que influeixen en la salut. En aquest sentit, la barrera intestinal serveix com a primera línia de defensa contra antígens, patògens i toxines luminals, alhora que facilita l'absorció de nutrients i la vigilància immunitària.³ La disrupció de la integritat de la barrera intestinal, ja sigui per factors dietètics, disbiosi o desregulació immunitària, pot tenir conseqüències per a la salut sistèmica. Per exemple, en l'obesitat, el consum excessiu de dietes altes en greixos i sucres pot alterar la integritat de la barrera intestinal i promoure la inflamació de baix grau, que contribueix a la disfunció intestinal i l'endotoxèmia metabòlica sistèmica.⁴ No obstant això, se sap que una dieta equilibrada rica en fibra i compostos bioactius afavoreix i manté una funció intestinal saludable.⁵

Pel que fa al reconeixement dels aliments, els receptors del gust s'han identificat com a dianes potencials dels components dels aliments. Aquests receptors es troben en diversos teixits extraorals, l'intestí inclòs, i s'associen amb la detecció de continguts luminals i respostes epitelials moduladores, que s'ha descrit que regulen la funció enteroendocrina i immune.⁶ A més, diversos estímuls com els components dels aliments,

la patologia o l'edat podrien modular l'expressió dels receptors del gust i influir en les seves funcions fisiològiques.⁷

A la llum d'aquesta evidència, explorar la relació entre la dieta, la salut intestinal i el benestar general sobre com una bona via de recerca. Per tant, l'objectiu d'aquesta introducció és revisar els coneixements actuals sobre (1) la sostenibilitat de la producció d'insectes, els beneficis i preocupacions del consum d'insectes i el seu possible impacte en el manteniment de la funció intestinal; (2) l'estructura del tracte gastrointestinal, la funció de la barrera intestinal i la seva modulació, així com (3) la funció dels receptors del gust, les implicacions intestinals i immunitàries de la seva activació, i la seva possible modulació per la dieta.

2. Els insectes com a font alternativa de proteïnes

2.1 La necessitat de trobar fonts alternatives de proteïnes

La població mundial s'expandeix a causa d'una combinació de factors, incloent-hi la disminució de les taxes de mortalitat a escala mundial, les elevades taxes de fecunditat en regions específiques i el fenomen de l'impuls demogràfic. En conseqüència, les projeccions indiquen un augment d'1,3 milions de persones en els propers 30 anys, que culminarà en un valor estimat de 9,7 milions per al 2050.⁸ Per tant, la producció d'aliments ha d'augmentar, i una preocupació fonamental en aquest context és l'escalada de la demanda de proteïnes, que es preveu que hagi augmentat un 70 % aproximadament entre el 2012 i el 2050.¹

Entre l'espectre de macronutrients i micronutrients essencials derivats de la dieta, la proteïna assumeix un paper crític en la formació de teixits, els processos de reparació i la constitució dels enzims i hormones.^{9,10} L'aportació adequada de proteïnes representa el 10% de l'aportació energètica i la seva qualitat està íntimament lligada a la presència d'aminoàcids essencials, que són les fonts d'origen animal tradicionalment reconegudes per la seva qualitat superior en comparació amb la majoria de les fonts vegetals.¹¹ Ara bé, patrons dietètics occidentals, caracteritzats per un consum elevat de productes lactis, carn i ous, sovint superen els líndars dietètics recomanats per als greixos saturats i la carn vermella. L'adherència prolongada a aquestes dietes es correlaciona significativament amb l'augment de les taxes de mortalitat.¹² No obstant això, els ous, els làctics, la carn, el peix i els seus derivats, quan es consumeixen en quantitats adequades, destaquen com a fonts convencionals de proteïnes que també contenen altres nutrients essencials com lípids, vitamines i ferro.¹¹ Això els posiciona com a opcions altament nutritives, especialment en regions on l'accés als aliments és limitat, i protegeix contra la desnutrició.¹³ Així doncs, la seva producció ha experimentat un creixement exponencial per contrarestar la gran demanda de proteïna d'alta qualitat, i continuarà augmentant, principalment la producció ramadera.

Avui en dia, la ramaderia contribueix al voltant del 15% de les emissions totals de gasos d'efecte hivernacle (GEH),¹⁴ principalment de la producció bovina i ovina, tant directa (a través de la producció de metà pels remugants) com indirecta (a través de les emissions reactives de nitrogen i diòxid de carboni, i la desforestació associada a la producció de pastures i conreus farratgers).¹⁵ A més, la contaminació i l'escassetat d'aigua també estan vinculades amb aquesta producció d'aliments per a animals, i la posicionen com un dels principals contribuents al canvi climàtic.¹⁶

Per tant, el gran repte és alimentar una població humana en expansió enfocant la producció en aliments respectuosos amb el medi ambient.^{14, 17} En aquest sentit, els mètodes convencionals de producció d'aliments s'estan reavaluant davant d'aquest repte, i això dona lloc a un interès creixent per l'agroecologia. Aquest enfocament té com a objectiu transformar els sistemes productius actuals per potenciar-ne la sostenibilitat i reduir-ne la petjada ambiental.¹⁸ Un altre aspecte d'aquesta transició passa per reduir el consum de carn i productes lactis. Nombrosos estudis han emfatitzat la importància d'aquest canvi dietètic en la consecució dels objectius de canvi climàtic.¹⁹ Com s'ha esmentat abans, el sector ramader contribueix significativament a les emissions de gasos d'efecte hivernacle, i la seva reducció podria tenir un impacte substancial en la mitigació del canvi climàtic. No obstant això, en la recerca de l'adequació nutricional global, hi ha un interès creixent a explorar mètodes sostenibles per produir fonts de proteïnes noves i d'alta qualitat, que puguin tant servir com a aliment humà com ser ingredients per a l'alimentació animal. Això inclou explorar fonts de plantes actualment infrautilitzades, insectes i organismes unicel·lulars, com bacteris, algues i fongs,¹⁶ així com «carn» cultivada *in vitro*.¹⁴ Aquestes alternatives ofereixen la possibilitat de diversificar o substituir parcialment les fonts càrnies tradicionals, en línia amb els objectius de sostenibilitat i reducció de l'impacte ambiental.

2.2 L'impacte ambiental de les diferents fonts de proteïna

Algunes revisions interessants s'han centrat a descriure els beneficis ambientals de les fonts de proteïna que representen alternatives a la carn.²¹⁻²⁴ Les carns remugants, per exemple, tenen impactes que són de 3 a 10 vegades més elevades que altres aliments d'origen animal i de 20 a 100 vegades que els d'origen vegetal, per a tots els indicadors examinats.²⁵

En aquest context, les fonts vegetals semblen un substitut acceptat, ja que són presents de manera natural a la dieta de les persones, aporten beneficis per a la salut i el medi ambient i tenen menors costos de producció associats. Com a font de proteïna vegetal, s'hi inclouen plantes lleguminoses (per exemple, soja, llenties, llobins, cigrons), plantes oleaginoses, cereals (blat de moro, arròs, blat) i pseudocereals (amarant i quinoa).^{24, 26} Els estudis van demostrar que la producció d'1 kg de carn de boví requereix

50 vegades més terra i unes 15 vegades més aigua que la producció d'1 kg de gra i verdures. A més, s'ha descrit que la substitució del 25-50% dels aliments d'origen animal per altres d'origen vegetal resultaria en una reducció del 40 % de les emissions de nitrogen i del 25-40% en altres emissions de GEH a la Unió Europea.¹² Malgrat que la font vegetal també té un efecte beneficiós sobre la salut humana, ja que redueix el risc d'algunes malalties cròniques, generalment és deficient en aminoàcids essencials.²⁷ Per tant, combinar fonts vegetals en l'equilibri adequat és una bona solució per aconseguir perfils d'aminoàcids essencials adequats. D'altra banda, la proteïna microbiana, o proteïna «única» cel·lular (SCP), s'estableix com una alternativa potencial, ja que el cultiu de microorganismes no requereix un gran nombre de terres com en els conreus i la ramaderia, perquè els microorganismes solen conrear-se en tancs o reactors. La SCP inclou la proteïna derivada de microorganismes unicel·lulars o fins i tot pluricel·lulars, principalment fongs (llevats i fongs filamentosos), microalgues (cianobacteris i eucariotes unicel·lulars) i bacteris.²²

Finalment, encara que els insectes es troben entre les alternatives més controvertides a causa dels conflictes amb els hàbits culturals de diverses poblacions, són presents a la dieta d'altres poblacions de tot el món i tenen nombrosos beneficis ambientals i nutricionals. Els estudis indiquen que els indicadors ambientals com l'ús del sòl, la petjada hídrica i les emissions de GEH són un 40-60% més baixos per a l'alimentació i l'aliment dels insectes comestibles en comparació amb la ramaderia tradicional.^{1, 28, 29} A més, la capacitat dels insectes per alimentar-se de bioresidus, com ara residus de bolets o pells de fruites, redueix encara més l'impacte ambiental en convertir els residus en compost, la qual cosa també proporciona noves estratègies per a una bioeconomia circular.^{30, 31} Així mateix, l'eficiència de conversió de pinso, és a dir, l'aliment necessari per produir 1 kg d'augment de pes corporal, difereix significativament entre el bestiar convencional i els insectes. Per exemple, els grills són més eficients a l'hora de convertir l'aliment en massa corporal en comparació amb la ramaderia tradicional. La relació de conversió d'aliment del pes comestible mostra que els grills són dues vegades més eficients que els pollastres, quatre vegades més que els porcs i dotze vegades més que el bestiar boví,³² cosa que suggereix que els insectes són una font alternativa amb més rendibilitat. Aquesta eficiència subratlla el paper dels insectes com a sistema alimentari sostenible, la qual cosa, a més del seu valor nutritiu, contribueix positivament als impactes ecològics, ambientals i econòmics.³³

Per tant, en termes d'impacte ambiental, col·lectivament, aquestes fonts alternatives de proteïna ofereixen una solució més sostenible que la ramaderia tradicional. Redueixen la pressió sobre la terra i els recursos hídrics i contribueixen a reduir les emissions de gasos d'efecte hivernacle. Aquest canvi cap a proteïnes alternatives és essencial per mitigar els impactes ambientals de la producció d'aliments i donar suport a

la seguretat alimentària mundial. En particular, l'alta eficiència de conversió d'aliments, cicles de vida curts, les altes taxes de reproducció³⁴ i la capacitat de prosperar gràcies a una àmplia gamma d'aliments, inclosos els subproductes del processament d'aliments i els fluxos de residus d'alt impacte,³⁵ fan dels insectes una de les opcions més beneficioses per al medi ambient i econòmicament viables.³⁶

2.3 Consum d'insectes per part dels humans (entomofàgia)

Els insectes s'han consumit des del principi de l'evolució humana i més de dues mil espècies diferents d'insectes són consumides de manera regular per dos mil milions de persones a tot el món, principalment a l'Àfrica, a l'Àsia, a Oceania i a l'Amèrica del Sud.^{26, 37, 38} Aquesta pràctica de menjar insectes es coneix com a entomofàgia³⁹ i inclou el consum d'escarabats (coleòpters), erugues (larves de papallones i arnes; lepidòpters), abelles, vespes i formigues (himenòpters), i llagostes, saltamartins i grills (ortòpters).³² Durant mil·lennis, els insectes han estat una font important de proteïnes dietètiques en algunes poblacions humanes.⁴⁰ No obstant això, als països occidentals, l'entomofàgia és poc freqüent i s'associa a una pràctica repugnant.^{41,42} A causa d'aquesta barrera cultural, l'ús d'insectes processats com a ingredient en pols, que després s'incorpori a productes com hamburgueses, pasta o aperitius, podria millorar l'acceptació dels consumidors.⁴³ D'altra banda, més investigacions que verifiquin els beneficis en l'àmbit nutricional de consumir d'insectes i els avantatges ambientals també podrien millorar-ne el coneixement i l'acceptació per introduir-los a les nostres dietes.⁴² Així, la proteïna dels insectes podria passar a formar part de la proteïna total consumida pels humans en un futur proper.⁴⁴

Aquesta tendència emergent en les societats occidentals va començar el 2013, quan l'Organització de les Nacions Unides per a l'Alimentació i l'Agricultura (FAO) va assenyalar la necessitat d'enfocar les pràctiques modernes de ciències dels aliments a augmentar el comerç, el consum i l'acceptació dels insectes.³² El Reglament 2015/2283 del Parlament Europeu i del Consell de la Unió Europea va marcar un moment crucial, ja que incorporava insectes sencers i les seves parts en la categoria de nous aliments.⁴⁵ Addicionalment, el 2015, l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) va emetre una opinió científica sobre el consum d'insectes i proposava una llista d'espècies d'insectes amb alt potencial d'ús com a alimentació animal i també com a alimentació humana.⁴⁶ Actualment, l'EFSA ha expressat una opinió favorable sobre la seguretat larves del cuc de la farina (*Tenebrio molitor*),⁴⁷ la llagosta migratòria (*Locusta migratoria*),⁴⁸ larves de l'escarabat negre del jaç de les aus (*Alphitobius diaperinus*)⁴⁹ i el grill domèstic (*Acheta domestica*)⁵⁰ com a nous aliments.

D'altra banda, la Comissió Europea va autoritzar l'ús d'insectes com a pinso, inicialment per a l'aqüicultura el 2017 i posteriorment per a porcs i aus de corral el

2021.⁵¹ Tradicionalment, els pinsos comercials per al bestiar es componen de grans de pinso, com el blat de moro, la soja, la melca, la civada i l'ordi, i constitueixen aproximadament un terç de tots els cereals produïts. Els pinsos a base d'insectes representen una oportunitat per substituir els de cereals. Cal destacar que hi ha un interès creixent per incorporar proteïna d'insectes en les formulacions d'aliments per a mascotes, i les larves de mosca soldat negra són les més utilitzades en aquest sector.^{52, 53} A més, entre els candidats més prometedors i més estudiats per a la producció industrial de pinsos hi ha cucs de la farina, cucs de seda, saltamartins i tèrmits.⁵⁴

2.3.1 Cucs de farina per a l'alimentació humana i animal

Tenebrio molitor i *Alphitobius diaperinus* són formes larvàries de diferents espècies d'escarabats de la família dels tenebriònids, coneguts com els escarabats foscos.⁵⁵⁻⁵⁸ La femella pon típicament una mitjana de 400-500 ous, i l'etapa larvària dura aproximadament 6-8 mesos en condicions òptimes.⁵⁹ A més, mitjançant l'ajust de condicions específiques, se'n pot regular i optimitzar el cicle de vida per garantir una producció massiva eficient.⁶⁰ Com que l'ús d'insectes, la seguretat i el contingut nutricional varien segons l'etapa del cicle vital en què es consumeixen,⁶¹ cal destacar que es proposen i s'utilitzen principalment en forma de derivats de cucs crus o enriquits amb proteïnes (farines d'insectes) en matèria seca.

Amb gairebé dos mil milions de persones a tot el món que consumeixen insectes, els cucs de la farina, que sovint es troben en la farina i grans de cereals, també s'utilitzen per al consum humà,³² i a la Xina el cuc groc de la farina és un plat popular.⁶² Ambdues larves comestibles han estat avaluades positivament per l'EFSA i tenen un perfil nutricional similar: són riques en proteïnes i tot l'espectre d'aminoàcids, riques en àcids grassos essencials i vitamines, i més altes en certs minerals (particularment calci, coure, magnesi, ferro i zinc) que la carn i els ous convencionals.^{63, 64}

A més, els cucs de la farina s'han aplicat per a l'alimentació en diferents sectors animals i és un dels insectes més estudiats. D'una banda, el 2015, Bovera *et al.* va demostrar la viabilitat de substituir la farina de soja per farina de larves de *T. molitor* en dietes de pollastre d'engreix, en termes d'ingesta d'aliment i taxa de creixement, amb major ràtio de conversió d'aliment i efectes prebiòtics en pollastres d'engreix amb consum de *T. molitor*.⁶⁵ Així mateix, el mateix autor va realitzar un experiment paral·lel durant el període de creixement dels pollastres d'engreix i, de nou, va demostrar els efectes més saludables d'aquest insecte quan s'utilitza com a principal contribuent proteic a la dieta.⁶⁶ En l'alimentació aquàtica, *T. molitor* també s'ha considerat com a possible font alternativa de proteïnes per substituir la farina de peix.⁶⁷ Fins i tot, un estudi va descriure que també es pot utilitzar en un sistema de suport vital bioregeneratiu a l'espai, que proporcioni un sistema eficient per tractar els residus vegetals, i s'ha

proposat com a proteïna d'alta qualitat per als astronautes.⁶² A més, s'ha demostrat que *T. molitor* té un alt valor nutritiu i una considerable activitat bioactiva en animals i humans.^{29, 68} D'altra banda, *A. diaperinus*, l'escarabat negre del jaç de les aus, també presenta proteïnes d'alta qualitat i un perfil d'àcids grassos equilibrat.⁶⁹ No obstant això, aquest insecte no s'ha utilitzat tant per alimentar animals ni estudiat *in vivo* com el cuc de la farina. En aquest sentit, més estudis podrien millorar-ne l'aplicació en diferents sectors.

Finalment, la integració dels insectes i, en particular, dels cucs de la farina en la producció d'aliments i pinsos està en línia amb els esforços per promoure la sostenibilitat i reduir l'impacte ambiental i ofereix noves solucions als reptes alimentaris globals. No obstant això, malgrat el potencial d'acceptació creixent i el suport normatiu per al consum d'insectes, hi ha preocupacions sobre la possible reacció al·lèrgica, que requereix més estudis i regulacions en profunditat per garantir la seguretat dels consumidors.

2.3.2 Al·lergenicitat als insectes com a aliment

La prevalença de l'al·lèrgia alimentària en els països occidentals és de fins a un 6% i continua augmentant; per tant, representa un important problema de salut.^{70, 71} Les al·lèrgies alimentàries són reaccions adverses a antigens alimentaris específics, que típicament són inofensius per a la població general però desencadenen mecanismes immunològics en individus susceptibles.⁷² En aquest sentit, el consum d'insectes planteja preocupacions sobre les respostes al·lèrgiques en individus sensibilitzats o al·lèrgics a les proteïnes de crustacis, cacauets o àcars de la pols domèstica (HDM).⁷³ Dins de la família dels artròpodes, s'han identificat diversos al·lèrgens, incloent-hi la tropomiosina,⁷⁴ l'arginina-cinasa⁷⁵ i el glutatí S-transferasa,⁷⁶ que exhibeixen reactivitat creuada en humans.

De fet, Broekman *et al.* va trobar que 13 de cada 15 pacients al·lèrgics confirmats a les gambes van mostrar reaccions al·lèrgiques a *T. molitor*. L'exposició a fraccions de la proteïna del cuc de la farina va revelar la reactivitat creuada de la IgE en aquests pacients, amb la tropomiosina i l'arginina-cinasa identificades com els principals al·lèrgens reactius creuats en el cuc de la farina.⁷⁷ A més, es van identificar la tropomiosina, l' α -amilasa i la miosina muscular de tres cucs de la farina comestibles per reaccionar creuadament amb sèrums de HDM ($n = 11$) i pacients al·lèrgics a crustacis ($n = 8$).⁷⁸ Un altre estudi realitzat pels mateixos autors va introduir altres insectes (*Z. morio*, *A. diaperinus*, *G. mellonella*, *H. illucens*, *A. domesticus* i *Locusta migratoria*) als participants i va concloure una propensió a les reaccions al·lèrgiques no només a *T. molitor*, sinó també a altres insectes.⁷⁹ La tropomiosina, una vegada més, va emergir com un al·lèrgen creuat clau per als pacients al·lèrgics a HDM i gambes; així com les proteïnes de la

cutícula larvària, que semblaven jugar un paper important en la reactivitat creuada dels pacients principalment sensibilitzats al cuc de la farina.⁸⁰ D'altra banda, la tropomiosina de *G. bimaculatus* ha descrit que indueix una reacció al·lèrgica en individus amb al·lèrgia confirmada als crustacis.⁸¹

A més, un informe de cas de França va detallar una anafilaxi alimentària severa induïda per larves cuites de *T. molitor* en un home de 31 anys al·lèrgic a HDM però no a crustacis. Les proteïnes al·lèrgiques responsables d'aquesta sensibilització incloïen l'hexamerina, la tropomiosina, l' α -amilasa i les proteïnes de cutícula larvària A1A i A2B.⁸²

En canvi, en models de rosegadors sans, les llargues exposicions orals de rates Sprague-Dawley a dosis de 300-3.000 mg/kg/dia de cuc de la farina no van augmentar significativament els biomarcadors al·lèrgics com la histamina o les concentracions d'IgE en sèrum.⁸³

No obstant això, s'ha explorat mitigar o fins i tot eliminar al·lèrgens dels insectes durant el seu processament mitjançant mètodes com el tractament tèrmic i la hidròlisi enzimàtica.^{84, 85} Altres estudis científics en aquesta direcció estan en curs i ofereixen solucions valuoses per reduir l'al·lèrgenicitat de les formulacions que incorporen proteïnes d'insectes.

2.4 Valor nutricional dels insectes

Els insectes comestibles es caracteritzen per un excel·lent perfil nutricional, que els posiciona com una font alternativa de proteïnes viable tant per a humans com per a animals.

En l'etapa larvària, els insectes tenen un alt percentatge de proteïnes i, en algunes espècies, arriben fins al 60% del total de nutrients en termes de pes sec (taula 1).⁸⁶ A més, la proteïna dels insectes conté tots els aminoàcids essencials (AAE) i s'ha descrit que n'aporta nivells superiors als diaris recomanats per a adults.⁸⁷ Més enllà del seu contingut proteic, els insectes comestibles exhibeixen nivells elevats d'àcids grassos insaturats, inclosos els greixos monoinsaturats (de les sigles en l'anglès, MUFA) i poliinsaturats (de l'anglès, PUFA), així com dipòsits rics en minerals, vitamines i fibra.⁸⁸

⁸⁹ La seva riquesa nutricional s'estén a diversos micronutrients com coure, ferro, magnesi, manganès, fòsfor, seleni i zinc, juntament amb vitamines essencials com riboflavina, àcid pantotènic, biotina i, en alguns casos, àcid fòlic, i això posiciona els insectes com una excel·lent font de nutrients.⁹⁰ A més, estudis recents apunten que podrien proporcionar compostos bioactius, com els compostos fenòlics i flavonoides.⁹¹ Cal destacar que la composició de nutrients dels insectes està molt influenciada pel seu pinso, cosa que obre oportunitats per a la regulació, l'enriquiment i l'addició d'ingredients alimentaris específics.⁶¹

Taula 1. Composició nutricional dels insectes *Tenebrio molitor* i *Alphitobius diaperinus*, l'ametlla (com a font de proteïna vegetal) i la vedella (com a font convencional).^{47, 92, 93} SFA: àcids grassos saturats; MUFA: àcids grassos monoinsaturats; PUFA: àcids grassos poliinsaturats

Valor nutricional (100g de producte)	<i>Tenebrio molitor</i>	<i>Alphitobius diaperinus</i>	Ametlla	Vedella
Energia (kcal)	505	510	579	198
Proteïna (g)	57,2	59,6	21,2	19,4
Greixos totals (g)	28,4	28,7	49,9	12,7
SFA (g)	6,9	10,1	3,5	5,3
MUFA (g)	14,4	9,7	31,6	4,8
PUFA (g)	7,0	8,8	12,3	0,5
Carbohidrats (g)	1,8	2,7	21,6	0,0
Sucres (g)	0,2	0,5	3,6	0,0
Fibra (g)	6,4	7,74	12,5	0,0

Els aliments convencionals d'origen animal (ous, llet i carn), així com els aliments rics en proteïnes d'origen vegetal (soja), es consideren fonts proteiques d'alta qualitat perquè compleixen els requisits d'aminoàcids essencials o indispensables, i són fàcilment digerits i absorbits per l'intestí prim dels mamífers.⁹⁴ En canvi, a diverses fonts vegetals de proteïnes (cereals, mongetes, llegums o verdures) els manquen alguns AAE, i la digestibilitat proteica és menor que en els insectes comestibles.⁹⁵ Quan es comparen els insectes amb totes aquestes fonts proteiques, els estudis suggereixen que el contingut de proteïnes i AAE dels insectes és comparable als aliments convencionals d'alta qualitat animal i vegetal,⁹⁶ i presenten més valor energètic, àcids grassos insaturats i certes vitamines, però menys àcids grassos saturats que la carn. A més, contràriament a la carn, els insectes també són font de vitamina C i fibra dietètica.⁹⁷ El contingut proteic en insectes comestibles comuns com *Acheta domesticus* (72,45%), *Tenebrio molitor* (58%) i *Antharaea assamensis pupae* (38,05%) és superior al de llegums com les llenties (26,7%), les mongetes (23,5%) i la soja (41,1%).⁹⁸

La digestibilitat dels insectes és variable i es veu afectada per la presència de quitina,⁹⁹ que no es degrada ni s'absorbeix a l'intestí prim encara que és superior en aliments vegetals. Estudis recents apunten a la necessitat d'augmentar i millorar les avaluacions de la digestibilitat dels aminoàcids ileals i la síntesi de proteïnes postprandials in

vivo, per avaluar i comparar adequadament la qualitat de les proteïnes derivades d'insectes amb altres fonts proteiques.⁹⁶ En aquest sentit, Lanng *et al.* descriu una major quantitat d'aspartat, metionina, glutamat, aminoàcids de cadena ramificada (BCAA) i els aminoàcids aromàtics, tirosina i fenilalanina, que arriben a l'intestí prim, després de la ingestió d'insectes en comparació amb la ingestió de carn de porc.¹⁰⁰ A més, Dai *et al.* també va demostrar un major nivell de leucina, BCAA i EAA després del consum de proteïna de grill, mentre que la concentració d'aminoàcids no essencials i aminoàcids totals va ser major per a la proteïna derivada de la carn de boví.¹⁰¹

Tenint en compte l'evidència existent, els insectes s'han postulat com una font potencial de proteïnes d'alta qualitat, en termes de contingut d'aminoàcids essencials i digestibilitat. Així, els insectes es troben entre els futurs aliments suggerits per proporcionar alternatives de bona qualitat als aliments actuals d'origen proteic.²⁶

2.4.1 Salut més enllà de la nutrició: bioactivitat dels insectes comestibles

Com s'ha esmentat anteriorment, els insectes són una font de compostos bioactius, que poden tenir un efecte beneficiós sobre la salut quan es consumeixen. Exemples d'aquests compostos que es poden trobar en els insectes són pèptids, compostos fenòlics, la quitina i el quitosan.^{102–105} Els pèptids bioactius consten de 2 a 20 aminoàcids com a seqüència no activa de proteïnes, obtinguda a partir de la hidròlisi enzimàtica, la digestió *in vivo* o *in vitro*, la fermentació microbiana i altres tecnologies de processament.^{106, 107} La quitina i el seu derivat, quitosan, són polisacàrids altament presents en els insectes, perquè és el principal material orgànic de l'esquelet de l'artròpode.¹⁰² Per la seva banda, un gran nombre de polifenols identificats en insectes solen ser sintetitzats per les plantes hostes abans de ser metabolitzats o absorbits pels mateixos insectes.⁹¹ S'ha demostrat que la bioactivitat d'aquests compostos genera diversos beneficis per a la salut.

Per totes aquestes raons, hi ha un interès creixent en les potencials propietats bioactives dels components dels insectes i els seus hidrolitzats proteics,^{29, 44} incloent-hi propietats antioxidants, antimicrobianes, antihipertensives i antidiabètiques, que podrien aplicar-se en aliments funcionals o nutricionalment.⁹⁸

Efectes sobre el metabolisme i la ingesta d'aliments

La bioactivitat dels insectes s'ha suggerit en termes de millora del metabolisme i control del pes. D'una banda, alguns estudis han demostrat la inhibició de la DPP-IV, enzim responsable de la reducció de la insulina i, en conseqüència, de l'augment de glucosa en sang postprandial, per *Gryllobates sigillatus* o *Antheraea assamensis* hidrolitzats, i suggereix propietats antidiabètiques.^{108, 109} A més, estudis *in vivo* van mostrar l'eficàcia d'extractes etanòlics de cucs de seda i glicosaminoglicans de grills per millorar el me-

tabolisme de la glucosa i l'efecte antioxidant en ratolins diabètics de tipus 2.^{110, 111} La suplementació crònica amb larves de *Proteatia brevitarsis* durant set setmanes millora l'estat de salut dels ratolins alimentats amb una dieta alta en greixos (HFD, de l'anglès), en reduir l'augment de pes corporal (PC), el pes de greix epidídim i subcutani, i l'acumulació de lípids en els nivells hepàtics i plasmàtics.¹¹² Un altre estudi amb extractes etanòlics de *Gryllus bimaculatus* en rates alimentades amb dieta alta en greixos contraresten el dany induït per la dieta amb una reducció del pes gras abdominal i epidídim, els nivells de colesterol i triglicèrids, i suggereix un potencial antiateroscleròtic o antiinflamatori.¹¹³ No obstant això, pel que fa als efectes sobre PC, no hi ha consens sobre la ingesta de *T. molitor* en models animals. Les dosis altes de suplement de *T. molitor* van mostrar una tendència a augmentar el PC i el consum d'aliments en rates mascles.¹¹⁴ En rates obesas, la incorporació d'aquest insecte a la dieta va provocar efectes lipídics reductors en el fetge i el plasma.¹¹⁵ Per contra, alguns autors no van reportar cap efecte en el PC o la ingesta d'aliments després de tractaments crònics en rates mascles¹¹⁶ o femelles,⁸³ mentre que altres van indicar que les dietes basades en cucs van conduir a una reducció de l'augment de pes i a una millora del metabolisme en ratolins en situació d'obesitat induïda per la dieta.⁵⁸ A més, en un estudi previ del nostre grup de recerca, l'administració d'*A. diaperinus* va modificar la secreció enterohormonal intestinal *ex vivo* i es va associar a un augment de la ingesta d'aliments.¹¹⁷

Efectes antihipertensius

Se suggereix principalment que les propietats antihipertensives s'aconsegueixen a través de la inhibició de l'enzim convertidor de l'angiotensina I.¹¹⁸ Sousa *et al.* va demostrar la capacitat dels hidrolitzats de proteïnes d'*Alphitobius diaperinus* per inhibir eficaçment aquest enzim.¹¹⁹ *In vivo*, es va descriure que *Tenebrio molitor* pot reduir la pressió arterial, la freqüència cardíaca i la pressió de perfusió coronària de rates espontàniament hipertensives.¹¹⁶

Propietats antioxidants i immunomoduladores

Un estudi va determinar que la capacitat antioxidant *in vitro* era 5 vegades superior a la del suc de taronja natural, per a diferents extractes de saltamartins, cucs de seda i grills.¹²⁰ Zielinska *et al.* va demostrar que el contingut fenòlic total i la capacitat antioxidant, mesurada com la capacitat de neutralitzar ABTS^{•+} i DPPH[•], augmentava quan també s'augmentava el percentatge de farina d'insecte afegida en magdalenes.¹²¹ Aquesta propietat es va associar al contingut fenòlic però també als pèptids obtinguts dels hidrolitzats de proteïnes.¹¹⁸ Una anàlisi *in silico* va proposar que alguns pèptids amb activitat antiinflamatòria es podien trobar en *T. molitor*.¹²² En aquest sentit, un altre treball va demostrar que els preparats proteics derivats de la digestió *in vitro*

d'insectes (*G. sigillatus*, *T. molitor* i *S. gragaria*) podrien ser fonts de pèptids bioactius amb efectes antioxidants i antiinflamatoris que s'accentuaven després del procés de tractament tèrmic, que millora significativament aquestes propietats.¹²³ L'estudi també va demostrar que els hidrolitzats de proteïnes exerceixen efecte antiinflamatori mitjançant la inhibició de lipooxigenases (LOX) i ciclooxigenases (COX). Malgrat que aquesta propietat dels insectes no s'ha investigat àmpliament, un estudi va informar que el consum de grills durant 14 dies en adults sans va reduir la inflamació sistèmica en disminuir els nivells plasmàtics de TNF- α i va millorar la salut intestinal en augmentar el creixement de bacteris probiòtics.¹²⁴ D'altra banda, Park *et al.* va informar de l'efecte protector dels components bioactius d'*A. dichotoma* en la integritat de la barrera i les respostes inflamatòries en model amb inflamació vascular induïda per lipopolisacàrids (LPS).¹²⁵ A més, pèptids antimicrobians com les defensines, cecropins i melitina, que són components essencials del sistema immunitari innat, podrien obtenir-se d'algunes espècies d'insectes.¹²⁶ Finalment, se sap que el quitosan present en insectes actua com a agent quelant en sistemes biològics i té activitat antimicrobiana contra bacteris, llevats i fongs.¹²⁷

Efectes sobre la salut intestinal

Alguns estudis també han analitzat específicament els efectes del consum d'insectes en el tracte intestinal. Per exemple, es va descriure que *G. bimaculatus* suprimeix l'estrès oxidatiu intestinal i mitiga les respostes inflamatòries a l'intestí prim, ja que el protegeix de la hiperpermeabilitat induïda pel consum d'alcohol en ratolins.¹²⁸ Un altre estudi va informar de la reducció de l'expressió gènica d'IL-1 β , IL-6 i TNF- α , així com de l'atenuació dels canvis patològics en el còlon induïts per DSS en ratolins, quan s'alimentaven amb pols de larves de *Tenebrio molitor*.¹²⁹

En un treball recent, la substitució parcial i total de la farina de peix per farines d'*A. diaperinus* i *T. molitor* va mostrar un creixement saludable, una composició saludable del microbioma i una expressió gènica immune saludable en els salmons atlàntics.¹³⁰ A més, Ge *et al.* va proposar que una dieta que incorpora cucs de farina millora la funció immunitària intestinal en un model de dany intestinal de peix, i proporciona evidència de beneficis per a la salut també en la indústria de l'aquicultura.¹³¹

D'altra banda, tenint en compte que l'intestí és un hàbitat per a milers de bacteris que componen la microbiota, que poden metabolitzar compostos dels aliments ingerits i influir tant en la salut intestinal com en general, alguns estudis han explorat la modulació de la microbiota pel consum d'insectes. Per exemple, Young *et al.* van estudiar la fermentació de diferents larves digerides *in vitro* en cultius de lots fecals humans, i van demostrar l'augment de bacteris amb propietats antiinflamatòries i associacions amb la salut intestinal.¹³² D'altra banda, un estudi va apuntar que el consum de

larves d'insectes induïa una lleugera millora en la microbiota fecal de pollastres, ja que millorava la població de bacteris productors d'àcids grassos de cadena curta (SCFA).¹³³ En rates, una substitució parcial de la carn per proteïna aïllada d'*A. diaperinus* també va resultar en alteracions de la composició del microbioma, acompanyades de canvis gastrointestinals i plasmàtics del perfil de metabòlits.¹⁰⁰ A més, en l'estudi de Kang *et al.*, *T. molitor* o *A. diaperinus* es van incloure en la dieta de ratolins d'obesitat induïda per la dieta i van donar lloc a canvis en el microbioma intestinal i a beneficis metabòlics per a aquests animals.⁵⁸ Segons totes aquestes evidències, el consum d'insectes podria induir canvis en el microbioma d'animals i humans i, en conseqüència, en el sistema intestinal i sistèmic, que podrien estar associats a beneficis per a la salut.

Taula 2. Publicacions dels efectes de consumir insectes en models animals sobre la inflamació, salut intestinal i funció barrera

Espècie d'insecte	Tipus cel·lular o model animal	Health status	Efecte	Referència
<i>A. dichotoma</i>	<i>In vitro</i>	Cèl·lules endoteli tractades amb LPS	Protecció inflamació i disrupció barrera	Park <i>et al.</i> 2020 ¹²⁵
<i>G. sigillatus</i> <i>T. molitor</i> <i>S. gragaria</i>	<i>In vitro</i>	-	Inhibició de la LOX i COX	Zielińska <i>et al.</i> 2018 ¹²³
<i>G. sigillatus</i>	Humà	Sà	Creixement bacteris probiòtics + TNF- α nivells plasmàtics	Stull <i>et al.</i> 2018 ¹²⁴
<i>T. molitor</i>	Ratolí	Colitis induïda per DSS	Protecció colònica + IL-1 β , IL-6, TNF- α expressió gènica	Park <i>et al.</i> 2023 ¹²⁹
<i>G. bimaculatus</i>	Ratolí	Hiperpermeabilitat i estrès oxidatiu induïts per l'alcohol	+ Estrès oxidatiu + Inflamació	Hwang <i>et al.</i> 2019 ¹²⁸
<i>T. molitor</i> <i>A. diaperinus</i>	Ratolí	Obesitat induïda per HFD	+ Expressió gens relacionats amb immunitat i apoptosi	Kang <i>et al.</i> 2023 ⁵⁸
<i>T. molitor</i>	Perca americana	Dany intestinal	Millora funció immune intestinal	Ge <i>et al.</i> 2023 ¹³¹
<i>T. molitor</i> <i>A. diaperinus</i>	Salmó atlàntic	Sà	Expressió gens relacionats amb immunitat intestinal	Hadbe-Tsion <i>et al.</i> 2024 ¹³⁰

<i>T. commodus</i> <i>C. giveni</i>	Cultius de femta humana	Sà	Millora microbiota Propietats antiin- flamatòries i salut intestinal	Young <i>et al.</i> 2020 ¹³²
<i>H. illucens</i> <i>T. molitor</i>	Pollets	Sà	= composició mu- cines = Resposta immune local Millora microbiota cecal	Colom- bino <i>et al.</i> 2021 ¹³³
<i>T. molitor</i>	Pollastres	Sà	Ràtio conversió aliments Allargada intestí	Bovera <i>et al.</i> 2016 ⁶⁶

Tenint en compte totes aquestes evidències, els insectes o productes que els puguin incorporar com a ingredients es presenten com a alternatives saludables i comparables amb els productes carnis,⁸⁹ i com a fonts potencials de compostos bioactius.⁹¹ No obstant això, hi ha una manca d'estudis de la bioactivitat intestinal del consum insectes. Per tant, realitzar-ne més *in vivo*, que explorin específicament els seus beneficis per a la salut, podria servir com un factor motivador perquè les persones incloguin aquesta font de proteïna alternativa com un component habitual de la seva dieta diària.

Així doncs, l'exploració dels efectes del consum d'insectes en el tracte gastrointestinal és una àrea d'investigació prometedora per comprendre el seu impacte més ampli en la salut general. A més, calen estudis a llarg termini amb diferents proporcions d'insectes i proteïnes d'insectes per dilucidar-ne completament els efectes i mecanismes subjacents en el cos.¹ Aquesta recerca és essencial per augmentar el coneixement científic d'aquests nous aliments amb la finalitat d'augmentar l'acceptabilitat social dels insectes comestibles, principal barrera per a la seva introducció en les dietes occidentals.

3. El tracte gastrointestinal i la modulació de les seves funcions per als aliments

3.1 Anatomia, fisiologia i funció general de l'intestí

El tracte gastrointestinal (GI) representa la superfície més gran entre el medi extern i l'interior del cos humà.¹³⁴ L'intestí és l'òrgan responsable de la digestió i absorció de nutrients. Quan els components dels aliments arriben a l'intestí, conclou el procés digestiu iniciat a la cavitat oral. En primer lloc, a l'intestí prim, l'aigua i els nutrients de

mida més petita, inclosos sucres, aminoàcids lliures i ions, s'absorbeixen a la circulació sanguínia. Posteriorment, a l'intestí gros o al còlon, s'hi acumulen molècules i fibres més grosses per ser descompostes per la microbiota, també coneguda com a fermentació de fibra, i té lloc l'absorció d'altres nutrients, com les vitamines.¹³⁵ A més, l'epiteli intestinal serveix de barrera física que separa dos compartiments oposats. En aquest sentit, més enllà del seu paper en l'absorció de nutrients, assumeix el paper en la defensa de l'organisme enfront dels patògens luminals,¹³⁶ i controla la resposta immunitària de la mucosa i l'activitat metabòlica de l'intestí.

El sistema gastrointestinal està connectat als sistemes vascular i limfàtic, i facilita la regulació de la ingesta d'aliments i la funció digestiva i el lliurament de compostos ingerits als òrgans de tot el cos.^{137, 138} A més, està estretament connectat amb el sistema nerviós. A la paret del tracte gastrointestinal, una extensa xarxa neuronal forma el sistema nerviós entèric (ENS), que també està implicat en la mobilitat, l'activitat secretora i immunològica del tracte gastrointestinal.¹³⁹ Així mateix, també s'ha descrit un eix intestí-cervell, pel qual diversos pèptids o hormones que són secretades per l'intestí en resposta als nutrients entren a la circulació i actuen directament sobre el cervell per ajudar a mantenir l'homeòstasi.¹³⁸ Aquests vincles amb els sistemes circulatori, immunitari i nerviós subratllen l'impacte sistèmic dels processos intestinals, i esten la seva influència molt més enllà del tracte digestiu.

En els últims anys, l'intestí ha guanyat atenció pel seu paper fonamental en la fisiopatologia d'alguns trastorns de salut. D'altra banda, el coneixement existent dels efectes cel·lulars exercits pels nutrients a través de l'intestí evidencia la possibilitat de la desregulació de l'homeòstasi intestinal per alguns components de la dieta, mentre que altres poden oferir una modulació positiva.^{140, 141} Així doncs, la identificació i interpretació dels mecanismes pels quals els hàbits nutricionals i els compostos dietètics influeixen en la salut intestinal promovent i/o restaurant la seva homeòstasi és un important camp d'estudi que requereix un coneixement de l'estructura intestinal i les seves funcions.

Estructura intestinal i procés de digestió

El sistema intestinal humà adult consta de dues parts: l'intestí prim, que mesura aproximadament 6-7 m de longitud i 2,5-3,0 cm de diàmetre, i l'intestí gros, que oscil·la entre 1,5 i 2 m de longitud amb un diàmetre de 6-7,5 cm.^{137, 142} L'intestí prim es divideix anatòmicament en tres regions diferents —el duodè, el jejú i l'ili—, mentre que l'intestí gros està segmentat en cec, còlon ascendent i descendent, recte i anus.

Histològicament, la paret del tub muscular que es reconeix com a intestí està formada per diferents capes: mucosa, submucosa, *musculosa propria* i serosa. La mucosa, la capa més interna de l'intestí, està constituïda per la *lamina propria*, les mucoses musculars i l'epiteli. La *lamina propria* és una capa de teixit connectiu reticular formada

per elastina, reticulina, fibres de col·lagen, limfòcits, cèl·lules plasmàtiques, granulòcits, vasos limfàtics i capil·lars. En canvi, la *musculosa mucosa* és una fina capa de múscul llis entre la mucosa i la submucosa. Ambdues capes ofereixen suport i articulen la capa de l'epiteli.¹⁴³ Finalment, la serosa és una membrana llisa formada per una fina capa de teixit connectiu i una fina capa de cèl·lules que secreten líquid serós per lubricar les estructures internes.¹⁴⁴

Al llarg de l'intestí, l'epiteli es plega per formar estructures com són les vellositats i les criptes (figura 1), descrites com projeccions luminals o invaginacions que augmenten significativament l'àrea superficial.¹⁴⁵ A més, la superfície apical dels enteròcits està coberta per projeccions microscòpiques semblants als dits anomenades microvellositats (100 nm de diàmetre), que augmenten més l'àrea d'absorció (M) i confereixen uns 30 m² de superfície a l'intestí prim.¹⁴⁶

El procés digestiu té lloc a tot l'intestí, amb funcions específiques a cada part. El quim, massa d'aliments semidigerits, arriba de l'estómac al duodè, la primera part de l'intestí prim, que passa d'un ambient àcid a un pH neutre i a un estat més líquid anomenat quil. Els enzims del pàncrees i els àcids biliars arriben a aquesta regió per descompondre proteïnes, greixos i hidrats de carboni, així com per emulsionar els greixos.¹³⁵ Progressant des del duodè, el jejú i l'ili constitueixen una gran superfície per permetre l'absorció de les petites molècules produïdes. En tot aquest procés, els moviments del peristaltisme són importants per exercir la barreja i el transport del quil per totes les seccions intestinals. En arribar al còlon, la microbiota que hi resideix porta a terme la fermentació dels components residuals dels hidrats de carboni que encara no han estat digerits, a causa de l'ambient anaeròbic característic del còlon.¹⁴⁷ A més, aquí també es produeix el trencament de les proteïnes i pèptids restants, inclosos els derivats de l'hoste (com les mucines). Els productes generats són absorbits pels enteròcits de les criptes i serveixen com a molècules de senyalització, ja que inicien respostes immunitàries i metabòliques sistèmiques.^{146,147} Simultàniament, el quil es torna menys líquid, a causa de l'absorció d'aigua i de minerals, i s'emmagatzema i compacta en el còlon descendent abans d'una eventual defecació.

Tipus cel·lulars

El tracte gastrointestinal està compost per diferents tipus de cèl·lules epitelials en la línia epitelial. A la base de les criptes hi ha cèl·lules mare indiferenciades,¹³⁵ que es desenvolupen en tipus de cèl·lules epitelials funcionals: enteròcits o colonòcits, cèl·lules de Paneth, cèl·lules en plomall (*tuft*), cèl·lules caliciformes (*goblet*) i cèl·lules enteroendocrines¹⁴⁵ (figura 1). Aquestes cèl·lules regeneren contínuament l'epiteli (cada 3-5 dies) mentre migren per l'eix cripta-vellositats abans de sotmetre's a una apoptosi programada.¹⁴⁸ Cada tipus madura segons la seva funció específica i migra amunt i fora de la cripta per tot l'intestí. No obstant això, la distribució de cada tipus cel·lular varia segons la funció específica de cada regió.¹⁴⁹

Les cèl·lules epitelials intestinals formen una barrera física, ja que són impermeables al contingut luminal.¹⁵⁰ Els enteròcits, el tipus cel·lular més abundant, i les cèl·lules enteroendocrines es troben per tot l'intestí i estan implicats en l'absorció de nutrients i aigua, i la producció d'hormones, respectivament.¹⁵¹ Les cèl·lules caliciformes, que es troben en major nombre a l'intestí gros, són les encarregades de produir mucus; mentre que les cèl·lules de Paneth resideixen a l'intestí prim i contribueixen a la immunitat innata secretant pèptids antimicrobians, proteïnes i altres components que són importants en la defensa i immunitat de l'hoste.¹⁵² Les cèl·lules en plomall són cèl·lules quimiosensorials, que recentment s'han descrit també com a cèl·lules secretores que inicien la resposta immunitària de tipus 2, juguen un paper crucial en la detecció d'infeccions parasitàries o al·lèrgens i desencadenen la reacció immunitària adequada.¹⁵³ Finalment, en zones específiques de l'epiteli anomenades plaques de Peyer, hi ha cèl·lules especialitzades anomenades cèl·lules M, que són capaces de transportar antígens luminals i bacteris, i presentar-los als limfòcits que activen o inhibeixen la resposta immune.¹⁵⁴

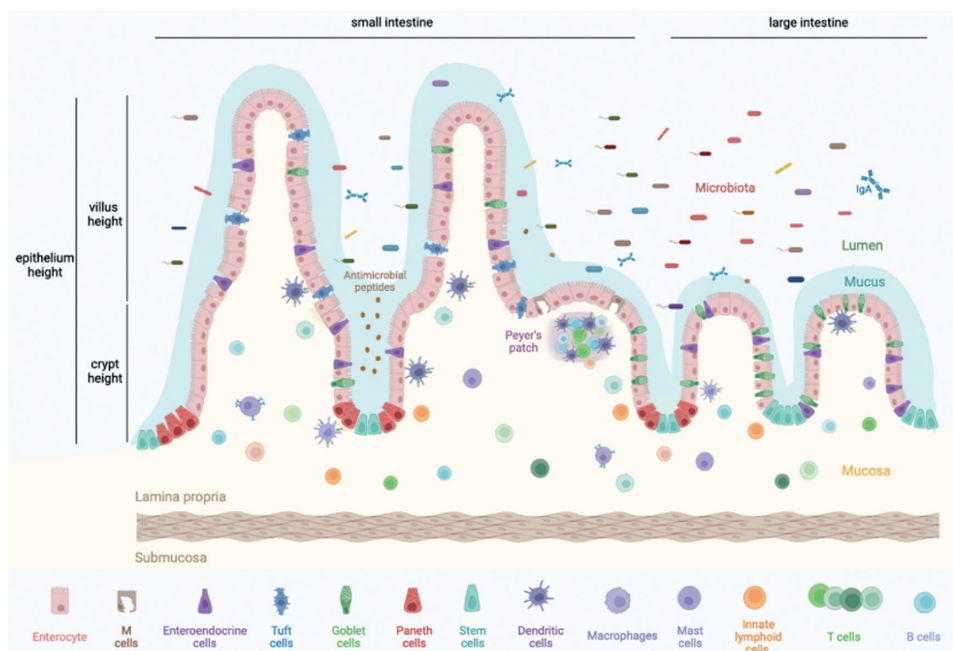


Figura 1. Estructura i composició intestinal. Diferents estructures de l'intestí prim i gruixut, i la morfologia de l'epiteli. Capes de la barrera intestinal que s'estenen des del lumen fins a la submucosa. Al lumen s'hi troben components com la microbiota intestinal, els pèptids antimicrobians, IgA i els compostos derivats de la microbiota com l'LPS. La capa de mucus actua com a barrera, i impedeix el contacte directe entre la microbiota intestinal i les cèl·lules epitelials. La capa cel·lular epitelial consisteix principalment en enteròcits, al costat d'altres tipus de cèl·lules secretores, incloent-hi enteroendocrina, cèl·lules de plomall, i cèl·lules caliciformes i de Paneth. Diversos tipus de cèl·lules immunitàries poblen la làmina pròpia, i serveixen per protegir el cos contra antígens i bacteris, de manera que prevenen la inflamació sistèmica. Creat amb BioRender.com

Sota la monocapa de cèl·lules epitelials, la *lamina propria* està constituïda per poblacions molt diverses de cèl·lules, que inclouen cèl·lules immunitàries com limfòcits B i T, cèl·lules dendrítiques (CD), macròfags, eosinòfils, neutròfils i mastòcits, entre d'altres.¹⁵⁵ Les CD es localitzen principalment en contacte amb l'epiteli a l'intestí prim, però també es poden trobar al gros en resposta a estímuls inflamatoris.¹⁵¹ Posseeixen la capacitat de capturar, processar i presentar antígens a limfòcits T naïfs i contribueixen a la resposta immunitària i la tolerància.¹⁵⁶ En canvi, els macròfags, àmpliament presents en tota la longitud de l'intestí, capturen i maten microbis, fagociten material apoptòtic i cèl·lules mortes, i secreten citocines.¹⁵⁷ Els neutròfils, d'altra banda, juguen papers tant en la iniciació com en la resolució de la inflamació: contribueixen a l'activitat fagocítica i recluten altres cèl·lules immunitàries mitjançant l'alliberament de citocines.¹⁵⁸ Els eosinòfils, localitzats principalment al duodè, són granulòcits implicats en l'eliminació de paràsits, la regulació de les respostes de les cèl·lules T, la promoció

de la reparació de teixits i la contribució a respostes al·lèrgiques.^{159, 160} Els mastòcits, en constant interacció amb els eosinòfils, són fonamentals en el desenvolupament de la resposta al·lèrgica, ja que alliberen histamina i mediadors inflamatoris, de manera que influeixen en les funcions d'altres cèl·lules immunitàries.¹⁶¹ Finalment, els limfòcits T i B estan implicats en la resposta adaptativa immune amb papers crítics en la vigilància immunitària, tolerància i defensa mitjançant la generació de cèl·lules efectores i anticossos específics d'antigen per neutralitzar i eliminar patògens.¹⁶²

En conjunt, les cèl·lules de l'epiteli intestinal i els factors secretats, juntament amb la diversa gamma de cèl·lules immunitàries presents a la *lamina propria*, formen la barrera intestinal,¹³⁴ un concepte que s'explica en profunditat en l'apartat següent.

3.2 Barrera intestinal en salut i malaltia

3.2.1 Homeòstasi de la barrera intestinal

La barrera intestinal fa referència al complex sistema encarregat de mantenir un delicat equilibri entre absorció i protecció. Formada per la microbiota, la capa epitelial, el mucus, pèptids antimicrobians i cèl·lules immunitàries, la barrera intestinal actua com a primera línia de defensa contra patògens i substàncies nocives presents en el lumen intestinal.¹⁶³ D'aquesta manera, la barrera integra els factors físics, bioquímics i immunològics, un sistema que orquestra un mecanisme de defensa multifacètic per mantenir la salut intestinal i general.

Microbiota intestinal

La part luminal de la mucosa conté uns 100 bilions de microorganismes, coneguda com a microbiota intestinal. En general, està composta per bacteris de 6 filums, entre els quals *Firmicutes* i *Bacteroidetes* són els principals tipus, però també contenen fongs, virus, i arqueus.¹⁶⁴ Durant l'embaràs, amb els bacteris presents a la placenta i a l'entorn uterí, i principalment en néixer, es dona la primera introducció de la microbiota a l'organisme.^{165, 166} Després, molts factors neonatals i postnatsals, com la lactància materna, també juguen un paper crucial en l'establiment de la microbiota i el sistema immunitari del lactant.¹⁶⁷ Així, la microbiota és única entre individus i pot variar dins d'un mateix individu, a causa de l'edat, factors ambientals i dietètics.¹⁶⁸ A més, varia en contingut i quantitat en les diferents parts anatòmiques del tracte gastrointestinal; però es troba principalment al còlon, on el flux més lent del trànsit intestinal i l'ambient (pH, temperatura i nivells d'oxigen) afavoreixen el creixement dels tipus anaeròbics observats.^{168, 169}

La microbiota intestinal i les cèl·lules intestinals existeixen principalment en una relació simbiòtica, en la qual els bacteris contribueixen a la immunitat, fisiologia i

metabolisme de l'hoste, mentre que l'intestí proporciona un entorn ric en nutrients per als microbis.¹⁷⁰ El metabolisme de polisacàrids i proteïnes específiques podria requerir múltiples enzims i rutes bioquímiques produïdes per la microbiota. S'han identificat $3,3 \times 10^6$ gens microbians intestinals, que superen en nombre els gens codificants de proteïnes humanes en un factor de 150.¹⁷¹ En aquest sentit, un dels principals beneficis d'una microbiota intestinal «sana» és la fermentació colònica de la fibra dietètica, que resulta en la producció de diversos metabòlits, entre els quals SCFA, amoníac, amines i compostos fenòlics.¹⁷² La majoria dels SCFA són àcid acètic, àcid butíric i àcid propiònic i tenen efectes beneficiosos ben documentats sobre la salut intestinal i sistèmica.¹⁵⁰ Juguen un paper crucial en les respostes metabòliques i endocrines, ja que actuen directament com a font d'energia per a les cèl·lules hoste, però també estimulen la producció d'hormones intestinals i activen la senyalització al cervell per regular la ingesta d'aliments.¹⁷⁰ A més, la microbiota intestinal també té un paper clau en el manteniment de la integritat i funció de la barrera. Els SCFA posseeixen propietats antiinflamatòries i immunomoduladores,¹⁷² milloren la producció de mucus,¹⁷³ regulen la secreció d'interleucina-18 (IL-18) per part de les cèl·lules epitelials i immunitàries,¹⁷⁴ la secreció d'immunoglobulina A (sIgA)¹⁷⁵ i reforcen la barrera intestinal actuant sobre les unions estretes.¹⁷⁶ A més, altres metabòlits bacterians, com certs conjugats secundaris d'àcids biliars i metabòlits triptòfans, indueixen el desenvolupament de cèl·lules T reguladores del còlon (Treg).¹⁵⁰ Col·lectivament, els metabòlits intestinals juguen un paper local crític en el manteniment de l'homeòstasi intestinal i la regulació immune, alhora que exerceixen efectes sistèmics sobre la salut general.¹⁷⁷

Mucus i barrera epitelial

El mucus proporciona la primera protecció contra els microorganismes luminals,¹⁷⁸ en limitar el contacte dels microorganismes amb l'epiteli per reduir el risc d'invasió i infecció.¹⁵² El mucus està format principalment per mucines secretades per cèl·lules caliciformes, particularment MUC2, una gran proteïna d'alta glicosilat que confereix la propietat gelatinosa a la mucositat.¹⁷⁹ Aquesta densa capa també conté els pèptids antimicrobians secretats per les cèl·lules de Paneth, que inclouen defensines, lisozim, quimiocines, etc.¹⁸⁰ A més, la sIgA alliberada pels limfòcits B podria unir el mucus i ancorar els bacteris, i així contribuiria a l'aglutinació bacteriana i facilitaria la seva contenció a la capa de moc. Així mateix, aquest moc també proporciona una rica capa d'hidrats de carboni per a la microbiota de creixement lent.¹⁸¹

A continuació, les cèl·lules epitelials monocapa actuen com a barrera física regulant el pas de nutrients i aigua a la circulació, però evitant l'entrada de substàncies nocives, inclosos patògens, toxines i microbiota, a l'organisme.¹⁸² Aquesta permeabilitat selectiva està intervinguda per dues vies principals: les vies transepitelials/transcel·

lulars i paracel·lulars. Les transcel·lulars consisteixen en el transport de les substàncies predominantment regulat per transportadors selectius, mentre que les paracel·lulars s'associen amb el transport que es dona en l'espai entre cèl·lules epitelials.¹⁸³ La integritat i les propietats de permeabilitat paracel·lular de l'epiteli estan regulades per diversos tipus d'estructures adhesives anomenades unions.¹⁸⁴ Principalment, les proteïnes transmembrana més apicals, conegudes com a unió estreta (TJ), juguen un paper crucial en el control del contacte cel·lular i regulen la permeabilitat selectiva d'aquesta capa, ja que mantenen l'homeòstasi intestinal.¹⁸⁵ A més, les cèl·lules epitelials inclouen cèl·lules caliciformes i de Paneth que estan enfortint constantment la barrera mucosa mitjançant la producció de mucus i AMP, respectivament, així com cèl·lules M, conegudes per transportar els microorganismes, i molècules macro i solubles des del lumen intestinal fins a la regió subepitelial per iniciar la resposta immunitària de la mucosa.¹⁸⁶

Barrera immunològica

Per sota de l'epiteli intestinal hi ha la barrera immunològica de la mucosa intestinal, coneguda com a sistema immunitari de les mucoses, que constitueix l'òrgan immunitari més gran del cos humà (figura 2). Dins d'aquest sistema, diversos tipus de cèl·lules immunitàries es troben i es distribueixen en llocs immunes inductius i efectors. D'una banda, CD, macròfags, neutròfils, mastòcits, així com cèl·lules limfoides innates (ILC),¹⁸³ limfòcits T CD4+ (Th1, Th2, Th17, cèl·lules T reguladores), cèl·lules T CD8+ i cèl·lules plasmàtiques secretores d'IgA, que existeixen difusament a la *lamina propria* i conformen el lloc efector immunitari. En canvi, els llocs immunoinductius, com el teixit limfoide associat a l'intestí (GALT), abasten estructures limfoides organitzades que inclouen fol·licles de cèl·lules B amb centres germinals envoltats per una zona de cèl·lules T.¹⁸⁶ En conjunt, aquestes cèl·lules i llocs, juntament amb els altres components de la barrera, treballen conjuntament en la defensa contra la infecció per patògens i en el manteniment de la barrera intestinal.^{3, 150}

En primer lloc, els components del sistema immunitari innat, així com les cèl·lules epitelials, utilitzen receptors de reconeixement de patrons, com els receptors tipus Toll (TLR), per discernir entre components microbians patògens i antígens (Ag) inofensius. Aquests receptors reconeixen patrons moleculars associats a microbis (MAMP) que són estructures moleculars essencials per a la supervivència microbiana o patrons moleculars associats al dany, alliberats de cèl·lules hoste que s'enfronten a lesions o estrès molecular.¹⁸⁷ La seva activació indueix diverses vies intracel·lulars que resulten en la fagocitosis i/o desencadenen l'alliberament específic de citocines i quimiocines, i la secreció d'AMP, per iniciar una ràpida resposta immunitària proinflamatòria i protectora.¹⁸⁵ Els neutròfils actuen en la resposta immunitària innata primerenca,

fagocitant microbis i produint factors microbicides i interleucines (IL). Mitjançant la producció de proteïnes granulars, com la mieloperoxidasa (MPO), contribueixen a catalitzar la formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) que ajuden a matar directament els patògens.¹⁵⁸ Un cop finalitzades les seves tasques, els neutròfils se sotmeten a una apoptosi, i els macròfags els eliminen per resoldre la inflamació i la recuperació de la funció dels teixits. A més, els macròfags i les CD, com a fagòcits mononuclears, engoleixen i eliminen els bacteris patògens alhora que secreten mediadors immunes per a la comunicació cèl·lula-cèl·lula.¹⁷⁷ Les ILC, per la seva banda, no tenen activitat citotòxica directa, sinó que s'han descrit per secretar citocines com IL-22 que promouen la mucositat i la producció d'AMP.¹⁸³

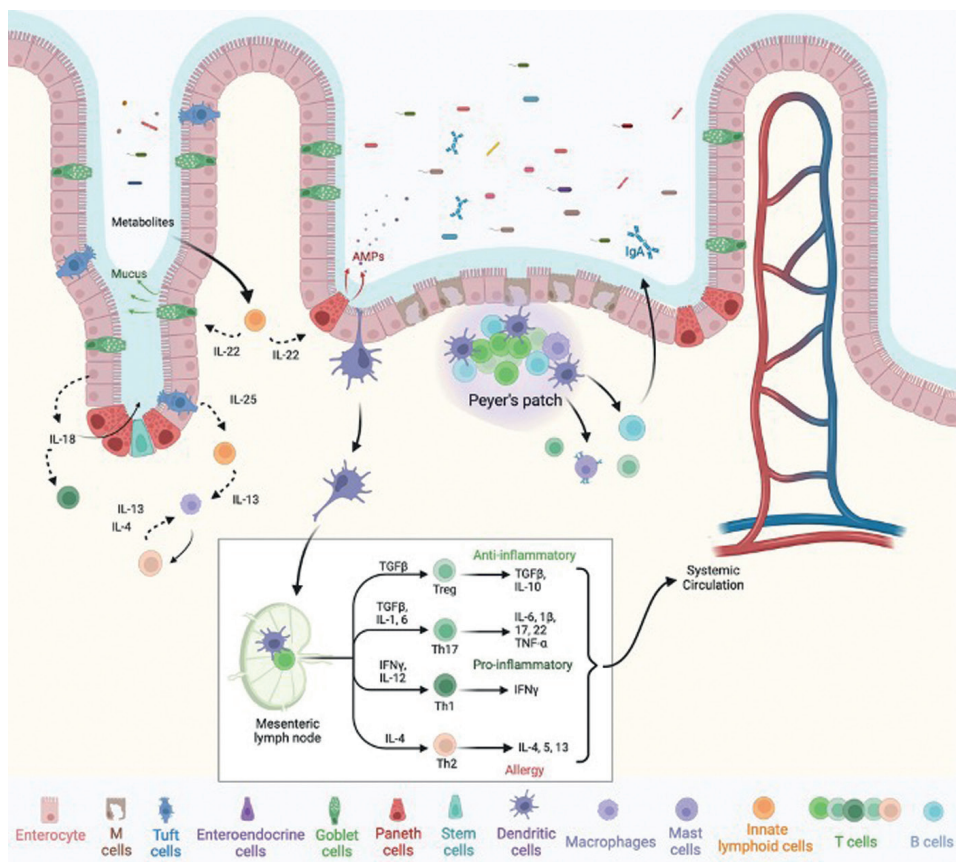


Figura 2. Funció barrera intestinal. Activació de cèl·lules caliciformes i de Paneth per produir mucús i AMP, respectivament. Secreció d'IgA per activació de limfòcits T i B de les plaques de Peyer. CD com a cèl·lula capturant antigen i presentació en estructures MALT per desencadenar la resposta immune específica. Creat amb BioRender.com.

Els CD intestinals i els macròfags són heterogenis i capaços de generar respostes per part de limfòcits T reguladors i efectors, en resposta al reconeixement microbià o l'Ag. Per exemple, les CD subepiteliales actuen com a sentinelles immunes, capturant i processant antígens i migrant als ganglis limfàtics mesentèrics (MLN) per iniciar una resposta immunitària adaptativa activant limfòcits T naïfs, que produeixen (via Th1 o Th17) o suprimeixen (via Treg) la inflamació.¹⁸⁸ D'altra banda, els llocs inductius de vegades existeixen en formes agregades com plaques de Peyer a l'intestí prim i fol·licles limfoides aïllats (ILF) a l'intestí prim i gros.¹⁵⁴ Col·lectivament, formen el GALT, responsable de respostes immunitàries específiques als antígens luminals i de la producció d'immunoglobulina A (IgA) per cèl·lules plasmàtiques diferenciades.¹⁸⁹ El GALT està format per l'àrea interfol·licular i l'epiteli associat al fol·licle, que consisteixen en cèl·lules M, i cèl·lules presentadores d'antigen, com les CD, que també expressen algunes unions estretes i els permeten penetrar a la capa epitelial.¹⁹⁰ Aquestes cèl·lules capten els antígens, els presenten als limfòcits T i B, i produeixen factors proinflamatoris, com TNF- α , IL-1 β o IL-6, que indueixen la diferenciació Th17.¹⁹¹ No obstant això, en resposta a la microbiota, els macròfags també produeixen IL-10, mentre que les CD produeixen TGF- β i àcid retinoic. Aquests compostos regulen la producció de citocines proinflamatòries i el desenvolupament de Treg, que segreguen més IL-10 i ajuden a mantenir l'homeòstasi immune suprimint respostes immunitàries excessives a antígens inofensius, inclosos bacteris comensals i proteïnes dietètiques, mitjançant un mecanisme conegut com a tolerància.¹⁹² Aquest mecanisme és crucial per prevenir la inflamació inadequada a l'intestí. Així, s'ha descrit que les CD i els macròfags tenen la capacitat d'impulsar la diferenciació de cèl·lules Treg que estan implicades en la tolerància a antígens orals solubles i bacteris comensals i la capacitat de proporcionar senyals directes per a la diferenciació dels tas1r3limfòcits B productors d'IgA.¹⁵⁶

L'activació de les cèl·lules Th17 i Treg promou el canvi de classe dels limfòcits B i la secreció d'anticossos secretors d'IgA,¹⁶² de manera dependent dels limfòcits T. Posteriorment, les cèl·lules T i B activades migren de GALT i MLN a sang perifèrica (figura 2). Cal destacar que l'intestí conté la major concentració de cèl·lules productores d'IgA, que secreten al dia uns quants grams d'anticossos al lumen.¹⁹³ A més, la sIgA podria produir-se de manera independent dels limfòcits T contra els bacteris comensals, principalment per factors produïts per CD, o IL-10, àcid retinoic i proteïna inductora d'IgA, entre d'altres.¹⁷⁵ La transcitosi d'anticossos IgA dimèrics a través de les cèl·lules epitelials està mediada pel receptor Ig polimèric.¹⁹⁴ A la mucosa, la sIgA té diferents funcions: uneix i reté bacteris a la mucositat (exclusió immune), es lliga la superfície bacteriana i a les toxines (neutralització), i facilita l'absorció d'antígens.¹⁹⁵

En resum, la barrera intestinal funciona de manera coordinada per regular la resposta immunitària intestinal amb l'objectiu de prevenir la infecció sistèmica i man-

tenir la salut general. En aquest sentit, és important saber que la dieta influeix significativament en la interacció entre la microbiota i la resposta immunitària, en proporcionar substrats per als bacteris intestinals i modular directament les cèl·lules immunitàries. Al seu torn, la funció barrera actua com a línia crítica de defensa contra patògens i al·lèrgens de la dieta, facilitant l'absorció de nutrients alhora que evita l'entrada d'antígens i microorganismes a l'organisme.¹⁸⁵ A més, la barrera immunològica interna permet la convivència pacífica amb els microorganismes intestinals, i orquestrar respostes inflammatòries i defensives adequades davant les amenaces.¹⁹⁶ La disfunció de la barrera intestinal, ja sigui per un augment de la permeabilitat epitelial o per un desequilibri en la composició de la microbiota intestinal, coneguda com a disbiosi, ha estat implicada en trastorns inflamatoris i al·lèrgies alimentàries, i contribueix a la progressió de malalties com el càncer, l'obesitat, la diabetis, o trastorns neurològics, per exemple.¹⁹⁷

3.2.2 *Disrupció de la funció intestinal*

La integritat de la barrera i la salut de la microbiota intestinal són crucials per mantenir la salut general i prevenir trastorns inflamatoris. Diferents insults com la dieta, l'alcohol, les drogues, les toxines, l'estrès i els patògens poden influir significativament en l'equilibri del microbioma intestinal, la permeabilitat intestinal i la resposta immunitària.^{198, 199} La barrera intestinal funciona com un sofisticat mecanisme de defensa i els seus components treballen junts de manera coordinada. El component glicolític principal de la membrana externa dels bacteris gramnegatius de la microbiota són els lipopolisacàrids bacterians (LPS), que es reconeixen com a endotoxines i poden desencadenar respostes inflammatòries a través de TLR.²⁰⁰ Quan la permeabilitat intestinal està compromesa, es produeix un augment de la translocació bacteriana / LPS a les capes intestinals internes, que dona lloc a una inflamació local i un empitjorament de la disfunció de barrera en un cercle viciós (figura 3). La reducció de la diversitat de la microbiota també pot donar lloc a una capa de mucus més fina, que promou una major interacció entre patògens i l'epiteli.¹⁸⁰ En conseqüència, el sistema immunitari de la mucosa ha de respondre mitjançant l'alliberament de citocines proinflammatòries, així com el reclutament de cèl·lules immunitàries addicionals al lloc de la inflamació. La resposta inflamatòria intestinal prolongada s'associa a alteracions metabòliques com l'obesitat, la síndrome metabòlica i la resistència a la insulina. A més, diversos estudis han reportat que l'augment de la permeabilitat de l'epiteli intestinal pot facilitar l'entrada de potencials al·lèrgens alimentaris i augmentar la sensibilització i els riscos d'al·lèrgia.^{201, 202} A més, la circulació sistèmica d'LPS a causa d'una neutralització inadequada per part del sistema immunitari intestinal condueix a l'endotoxèmia metabòlica i a la inflamació sistèmica crònica de baix grau.²⁰³ En aquest sentit, la disbiosi de la microbiota, la disfunció barrera i la inflamació de baix grau s'observen sovint en diver-

sos estats de la malaltia, incloent-hi la malaltia cardiovascular, el càncer, l'obesitat, les malalties respiratòries, la diabetis, la malaltia inflamatòria intestinal (IBD, de l'anglès), els trastorns cerebrals, la malaltia renal crònica i la malaltia hepàtica. Malgrat que no s'ha establert el seu paper causal en el desenvolupament de la malaltia, s'han proposat tractaments per millorar l'estat de la malaltia i restaurar la salut intestinal.⁸⁸

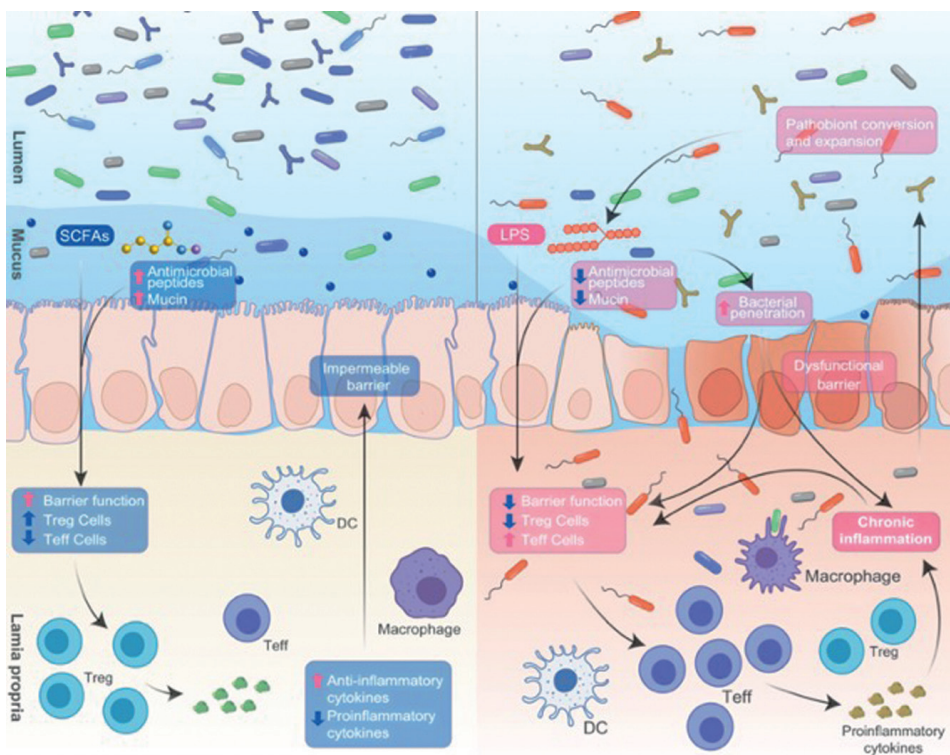


Figura 3. Barrera intestinal en estat sa i de malaltia. En un estat saludable, la barrera manté l'equilibri entre la microbiota, les capes de mucus i els àcids grassos de cadena curta (SCFA), que promou una capa epitelial robusta i l'activació de cèl·lules Treg, que secreten citocines antiinflamatòries. En estat de malaltia, la disrupció de la barrera permet el pas d'LPS i bacteris, que condueix a l'activació de cèl·lules T efectores (per exemple, Th1, Th2, Th17), i l'augment de citocines proinflamatòries, que desencadenen la inflamació crònica i l'exacerbació de la disfunció de barrera. Adaptat de Hou *et al.*²⁰⁴

Models d'inflamació i barrera alterada: dieta de cafeteria i injecció d'LPS

S'ha descrit àmpliament que una dieta equilibrada és essencial per mantenir un microbioma intestinal saludable, la integritat de la barrera intestinal i la tolerància immunitària. En canvi, una dieta desequilibrada, com la dieta occidental, pot conduir a una disminució de la diversitat de microbiota, disbiosi, alteració de la funció barrera i inflamació crònica.¹⁵⁰ Al laboratori, la dieta de cafeteria (CAF) s'utilitza per imitar la

dieta occidental humana en experiments amb animals, ja que consisteix en aliments altament saborosos i densos en energia com salsitxes i magdalenes.²⁰⁵ En comparació amb altres dietes altes en calories, la dieta CAF s'ha convertit en l'opció preferida per estudiar l'obesitat induïda per la dieta i la síndrome metabòlica en models animals.²⁰⁶ Les rates alimentades amb aquesta dieta durant cinc setmanes van mostrar un major augment de pes en comparació amb els controls, i altres canvis van començar a augmentar.²⁰⁷

Aquesta dieta es caracteritza per alts nivells d'hidrats de carboni i greixos simples, associats a la disbiosi, i baixos nivells de fibra, vitamines i minerals, nutrients que intervenen en el bon funcionament de la barrera. En aquest sentit, la permeabilitat intestinal observada en l'obesitat s'ha relacionat amb disbiosi microbiana, patrons dietètics (contingut en sucre i greixos) i deficiències nutricionals.²⁰⁰ D'una banda, la menor ingesta de fibra dietètica condueix a una disminució de la diversitat microbiana,²⁰⁸ mentre que un consum elevat de sucres i greixos simples condueix a una disminució de bacteris beneficiosos com *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* i un augment de bacteris gram negatius rics en LPS.²⁰⁹ D'altra banda, aquestes dietes s'associen amb criptes intestinals malmeses, reducció del nombre de cèl·lules caliciformes i canvis en la producció de mucines. A més, a causa del seu baix contingut en fibra, la microbiota catabolitzava proteïnes endògenes i glicoproteïnes del mucus, i això dona lloc a un augment dels nivells de metabòlits nocius i a la degradació de la mucositat.²¹⁰ Alhora, en l'àmbit de la capa epitelial, el consum excessiu crònic d'aquest tipus de dieta promou la pèrdua de proteïnes TJ.²¹¹ Finalment, les dades d'estudis en animals suggereixen que el greix de la dieta és el principal macronutrient responsable de l'endotoxèmia postprandial i que tant la quantitat com la qualitat del greix de la dieta tenen efectes diferents sobre l'endotoxèmia metabòlica.²¹² En aquest sentit, els persistents nivells circulants elevats de citocines inflamatòries associades a l'obesitat induïda també poden alterar l'estructura i localització de les TJ.²¹³

Aquesta reducció de la mucositat i l'alteració de la permeabilitat condueixen a una translocació del contingut luminal a la *lamina propria*, i augmenta la resposta immunitària de l'hoste al microbioma en permetre l'accés bacterià sense restriccions a l'epiteli;¹² això resulta en un augment de les endotoxines bacterianes en la circulació sistèmica i la inflamació intestinal i general.¹⁵⁰ La disrupció de l'homeòstasi intestinal afecta les cèl·lules Treg, fet que comporta la pèrdua de tolerància immune i respostes efectores aberrants, amb un augment de la secreció de citocines proinflamatòries a través de les vies Th1 i Th17.²¹⁴ En conseqüència, els monòcits sanguinis són reclutats als teixits inflamats, on alliberen una varietat de mediadors proinflamatoris, com ara TNF- α , factor infiltrant de macròfags, IL-1 β , IL-6, IL-12 i IL-18.¹⁵⁶ A més, l'activació persistent de neutròfils, l'augment d'infiltració i les baixes taxes d'apoptosi són fre-

qüents en aquesta situació, i contribueixen a la cronificació de la inflamació intestinal i sistèmica.¹⁵⁸

Així, la dieta occidental o de cafeteria provoca danys intestinals amb posterior inflamació sistèmica a causa de l'entrada d'endotoxines derivades de la microbiota al torrent sanguini, la qual cosa dona lloc a malalties com l'obesitat o la síndrome metabòlica.²¹⁵ Aquesta situació també s'aborda al laboratori amb tractaments amb LPS o sulfat sòdic dextrà (DSS) en models animals, teixits intestinals humans *ex vivo* i estudis de cultius cel·lulars.^{216–219} La injecció intraperitoneal d'LPS induïx una resposta inflamatòria sistemàtica i local que afecta la permeabilitat intestinal i agreuja la inflamació.^{218,219} La inflamació crònica de baix grau associada a l'endotoxèmia metabòlica és un factor important en el desenvolupament de moltes malalties cròniques en animals i humans.^{212,220}

Barrera intestinal i al·lèrgia alimentària

La funció de barrera immunitària intestinal és crucial per defensar-se dels al·lèrgens, i les interrupcions d'aquesta barrera poden contribuir al desenvolupament o exacerbació de les al·lèrgies alimentàries.

Normalment, la tolerància als antígens alimentaris es desenvolupa en edats primerenques de la vida, recolzada per factors com la lactància materna, que transfereix mediadors immunes de mare a fill. Aquest procés implica la participació de les DC i la diferenciació de cèl·lules T ingènues en cèl·lules Treg, així com la producció d'IL-10, i sIgA o sIgG, que inhibeixen la sensibilització a al·lèrgens alimentaris específics i promouen la tolerància immunitària.²²¹ No obstant això, la interrupció de la tolerància fisiològica condueix a la producció de citocines proinflamatòries com IL-4, IL-5 i IL-13 per a les cèl·lules epitelials intestinals i les DC, i canvia la diferenciació dels limfòcits ingenus cap a respostes al·lèrgiques (a través de Th2) en lloc de tolerància.⁷²

Aquesta resposta al·lèrgica consisteix en l'expansió de mastòcits, basòfils i, en conseqüència, eosinòfils a la mucosa, acompanyada del desenvolupament de limfòcits B productors d'IgE. Els mastòcits, cèl·lules clau en el desenvolupament de l'al·lèrgia, expressen en la seva superfície el FcεRI, un receptor IgE d'alta afinitat, al qual s'uneix la IgE específica a l'al·lèrgen produïda durant la fase de sensibilització. L'exposició posterior al mateix al·lèrgen alimentari s'uneix amb l'IgE específica de l'al·lèrgen en mastòcits, i desencadena una resposta de fase efectora (desgranulació) caracteritzada per l'alliberament de mediadors químics, com histamina, prostaglandines i leucotriens, que induïxen símptomes al·lèrgics.^{222,223} Per tant, l'augment de la producció total d'IgE està fortament associat amb la resposta al·lèrgica, i això fa que els nivells plasmàtics d'IgE siguin un marcador fiable quan se sospita al·lèrgia alimentària mediada per IgE.²²⁴

La investigació sobre l'origen de la malaltia destaca diversos factors que predisposen, inicien o exacerben la immunitat alterada en malalties al·lèrgiques, incloent-hi la disfunció inherent de la barrera epitelial, la pèrdua de tolerància immune, les alteracions en l'intestí i els microbiomes específics d'òrgans, la dieta i l'edat.²⁰² Per tant, la funció barrera intestinal té un paper fonamental en la prevenció o facilitació del desenvolupament de l'al·lèrgia alimentària. Una barrera alterada, un augment de la permeabilitat, la disbiosi o la desregulació del sistema immunitari de les mucoses poden contribuir al desenvolupament o exacerbació de les al·lèrgies alimentàries.²²⁵ En primer lloc, un intestí permeable pot permetre que nivells més alts d'al·lèrgens travessin l'epiteli i arribin a les cèl·lules immunitàries, especialment als mastòcits, de manera que estimularan les reaccions al·lèrgiques.²²⁶ En segon lloc, una microbiota sana promou la tolerància immunitària a proteïnes alimentàries inofensives promovent cèl·lules Treg, però el desequilibri de la microbiota pot sobreactivar la resposta immunitària a aquests antígens.²²⁷ A més, la desregulació de la resposta immunitària pot donar lloc a reaccions aberrants a les proteïnes de la dieta. Així mateix, aquesta disfunció de barrera epitelial i la cronicitat de l'estat inflamatori podrien reduir el llindar de sensibilització a substàncies innòcues a causa de l'entorn inflamatori i precipitar potencialment la sensibilització al·lèrgica.²²⁸ Una vegada més, també hi ha evidència que els mediadors alliberats dels mastòcits i altres citocines Th2 contribueixen a l'augment de la permeabilitat paracel·lular, i, per tant, és un cercle viciós.²²⁹

Les malalties relacionades amb la inflamació intestinal es caracteritzen per un augment de mastòcits i els seus productes de desgranulació a l'intestí prim i al còlon.²³⁰ Els tractaments amb LPS també augmenten la resposta Th2 amb l'augment de la secreció d'IgE, el reclutament i desgranulació de mastòcits i l'activació d'eosinòfils.^{218, 231}

En aquest sentit, la desregulació o alteració de la barrera intestinal podria produir inflamació intestinal, així com agreujar altres patologies relacionades amb la inflamació en l'àmbit sistèmic.

2.2.3 Interacció dietètica amb la barrera intestinal

Com s'ha esmentat anteriorment, la dieta, reconeguda des de fa temps com un dels factors externs més importants que influeixen en la salut, té un impacte primordial en la salut intestinal. Els components dietètics interactuen directament amb el tracte gastrointestinal i, per tant, influeixen en la seva integritat i composició.²³² Mentre que s'ha demostrat que la dieta típica occidental resulta en un intestí permeable i inflamació crònica, una dieta nutricionalment equilibrada, rica en fruites i verdures, és essencial per mantenir un microbioma intestinal saludable, preservar la integritat de la barrera intestinal, la tolerància immunitària i mantenir la fisiologia intestinal normal. A més, el consum de fruites i verdures en general, però també de proteïnes i peptíds vegetals,

polifenols, àcids grassos ω -3 i fibra dietètica, s'han associat amb beneficis per a la salut intestinal.²³³ En conseqüència, les nostres eleccions dietètiques influeixen en l'estructura, composició i funció de la microbiota, que interactuen amb l'epiteli intestinal i el sistema immunitari de les mucoses i per mantenir l'homeòstasi intestinal en un estat saludable.¹⁵⁰

En el context de la disbiosi, algunes teràpies basades en la microbiota, incloent prebiòtics i probiòtics, han sorgit com a tractaments prometedors.²³⁴ Els probiòtics, com *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, són microorganismes vius que tenen un o més efectes beneficiosos sobre l'hoste quan es consumeixen en quantitats suficients, mentre que els prebiòtics són compostos que són indigestos pel GIT humà i es descomponen pel microbioma o microorganismes probiòtics.²³⁵ Les principals fonts de prebiòtics inclouen fruites, verdures, llegums i cereals integrals, que contenen fibra dietètica i altres carbohidrats fermentables, també coneguts com a carbohidrats accessibles per la microbiota (MAC).²³³ S'ha descrit que la disponibilitat de fibra insoluble i MAC podria influir en la composició de la microbiota. A més, el seu consum s'ha associat amb una millora de la permeabilitat paracel·lular mitjançant la regulació de l'expressió de la proteïna TJ.²³⁶ Finalment, s'ha demostrat que el consum de MAC millora les situacions inflamatòries de baix grau induïdes per una dieta alta en greixos.¹⁸³ D'altra banda, una fibra dietètica insoluble com la quitina d'insectes s'ha relacionat àmpliament amb els beneficis actuals per a la salut, ja que promou el creixement de bacteris beneficiosos i inhibeix el creixement d'alguns bacteris potencialment patògens. A més, també s'ha demostrat que els derivats de quitina tenen propietats antiinflamatòries.²³⁷

Diversos estudis han demostrat que els pèptids bioactius derivats de proteïnes dietètiques poden influir en la salut intestinal modulant la funció barrera. En aquest sentit, s'ha descrit que estimulen la producció i secreció de mucus, augmenten la secreció d'IgA i indueixen la proliferació cel·lular epitelial.²³⁸ A més, els pèptids que poden afectar diferents fonts proteiques s'han relacionat amb l'augment de la diversitat de la microbiota i la regulació de la resposta immunitària.²³⁹ Altres autors també assenyalen que el consum de glutamina podria millorar la salut intestinal participant en la renovació de les cèl·lules epitelials i augmentant l'expressió dels TJ.²⁴⁰ No obstant això, cal més recerca sobre l'eficàcia de pèptids i aminoàcids bioactius de diverses i noves fonts proteiques, com els insectes, en el tractament o prevenció de malalties.

Altres compostos bioactius com els polifenols, que es troben principalment en fonts vegetals, exerceixen diversos efectes beneficiosos sobre la salut intestinal i la funció immune. S'ha suggerit que milloren la integritat intestinal modulant l'organització dels TJ i augmentant-ne l'expressió, que millora els defectes de barrera intestinal i l'endotoxèmia metabòlica induïda per una dieta alta en greixos.^{241, 242} De la mateixa manera, s'ha descrit que els àcids grassos ω -3 tenen aquestes propietats, i també que estan

implicats en la regulació de les vies de senyalització per reduir la inflamació epitelial, de manera que atenuen la producció de mediadors proinflamatoris i regulen la producció de mediadors proresolutius.²⁴³

En conclusió, la dieta és un factor clau que influeix en la salut intestinal, ja que se sap que hi ha aliments i nutrients que potencien la funció barrera intestinal.²³⁶ Més investigacions sobre aquests components dietètics, així com els aliments que poden contenir-los, podrien proporcionar informació valuosa per promoure la salut intestinal i prevenir malalties intestinals. A més, amb totes les evidències dels apartats anteriors, podríem concloure que la barrera intestinal és una interfície dinàmica que regula l'entrada d'aliments i patògens al tracte gastrointestinal, i afecta el manteniment general de la salut.

Finalment, pel que fa al reconeixement d'aliments, els components dietètics que arriben a l'intestí interaccionen amb els receptors del gust, que no es limiten a la cavitat oral sinó que també són presents al tracte intestinal.⁶ Com es descriu a la secció següent, aquests receptors intervenen en vies de senyalització associades amb funcions fisiològiques més enllà del seu paper en el gust i s'ha suggerit que influeixen en diverses respostes metabòliques i immunitàries.²⁴⁴ No obstant això, l'efecte de diferents patrons dietètics, com ara noves fonts proteiques, sobre els receptors intestinals del gust i els consegüents efectes sobre la barrera intestinal, però també sobre la salut general, necessita ser investigat més a fons i s'aborda en la present tesi.

3.3 Receptors del gust

El consum de components alimentaris activa una cascada de respostes dins nostre, que influeix en l'homeòstasi del nostre cos. Tradicionalment, el reconeixement dels components dels aliments ha estat dut a terme pels receptors del gust, proteïnes especialitzades situades predominantment en papil·les gustatives disperses per tota la cavitat oral.²⁴⁵ Aquests receptors juguen un paper fonamental en el reconeixement de compostos exògens presents en aliments i begudes, així com altres substàncies ingerides. Els senyals que generen es transmeten a través de nervis gustatius aferents a les estructures cerebrals encarregades del processament central del gust, i donen forma a la nostra experiència sensorial del sabor.²⁴⁶ No obstant això, la influència dels receptors del gust s'estén molt més enllà dels confins de la cavitat oral. Se'n coneix la presència en teixits i òrgans extraorals, que abasten des del cervell i la pell fins al sistema reproductor i el tracte gastrointestinal.²⁴⁷ L'abundància i la distribució en diferents teixits dels receptors del gust planteja la possibilitat que s'impliquin en altres funcions fisiològiques.²⁴⁸

Els receptors del gust són sensibles a diferents gustos, inclosos el dolç, l'amarg, el salat, l'àcid i l'umami. Els gustos salat i àcid són detectats per canals iònics; mentre que el canal epitelial de sodi (ENaC) respon als estímuls de sodi, el canal iònic selectiu

de protons Otop1 i la disminució del pH són encarregats de la transducció dels senyals àcids.^{249, 250} En canvi, els receptors umami, dolços i amargs pertanyen a la superfamília dels receptors acoblats a proteïnes G (GPCR) i es divideixen en dos tipus. Els noms estàndard segueixen la descripció de «receptor del gust, tipus X, membre X», abreujat en majúscules/majúscules (TASXRX) per als humans, i en minúscules per als rosegadors (TasXrX).^{251, 252} Els TAS1R, responsables del sabor dolç i umami, són GPCR amb un llarg aminoterminal i funcionen en dímers utilitzant TAS1R3 com a subunitat obligada. Concretament, l'heterodímer TAS1R2-TAS1R3 és l'encarregat de detectar la dolçor, mentre que els L-aminoàcids i ribonucleòtids interaccionen amb TAS1R1-TAS1R3 per formar la sensació gustativa coneguda com a umami.^{253, 254} Els compostos amargs són detectats per TAS2R, un receptor també de tipus GPCR amb un residu curt, i poden actuar com a monòmers.²⁵⁵ En els paràgrafs següents, TAS1R i TAS2R es descriuran amb més detall, ja que han estat un dels temes d'estudi d'aquesta tesi.

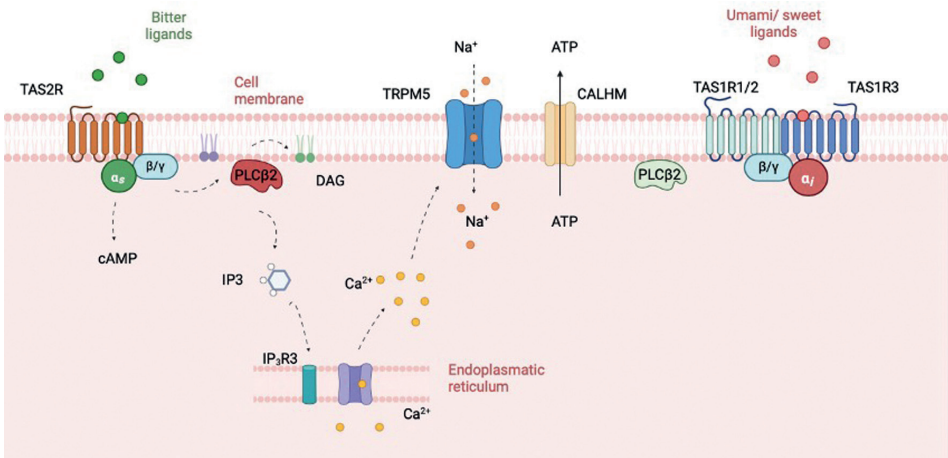


Figura 4. Via de senyalització del receptor del gust GPCR: quan el lligand s'uneix a TAS1R1/TAS1R3, TAS1R2/TAS1R3 o TAS2R, la proteïna G es dissocia i activa la producció d'IP3, la secreció de Ca^{2+} del reticle endoplasmàtic i el consegüent gradient de Na^{+} cap a l'interior cel·lular. Això acaba amb la secreció d'ATP, entre altres molècules efectores que indueixen la percepció del gust, o desencadena l'activació de diferents funcions. Creat amb BioRender.com

Les vies gustatives a través dels receptors gustatius pertanyents a la família GPCR, és a dir, el mecanisme de transducció dolç, umami i amarg, comencen amb la unió del lligand gustatiu al receptor específic, per induir un canvi conformacional (figura 4). Llavors, les proteïnes G heterotrimeriques unides a GTP (subunitats α , β i γ) es dissocien i les subunitats β i γ activen la fosfolipasa C2 unida a la membrana (PLC β 2), de manera que indueixen la producció d'inositol-1,4,5-trifosfat (IP3) i diacilglicèrids (DAG).^{248, 256, 257} L'IP3 s'uneix al seu receptor situat a la membrana del reticle endoplas-

màtic, activa els canals de calci i provoca un augment dels ions citoplasmàtics de Ca^{2+} . Aquest calci activa el receptor transitori de potencial canal catiónic de la subfamília M, membre 5 (TRPM5),²⁵⁸ que, juntament amb altres canals de Na^+ , augmenta els ions Na^+ . Les cèl·lules responen al senyal de sodi via despolarització i flux extracel·lular del neurotransmissor adenosina-5'-trifosfat (ATP) als nervis gustatius aferents, a través del modulador de l'homeòstasi càlcica 1 CALHM1 o CALHM1/CALHM3, i condueixen a la percepció del gust.²⁵⁹ No obstant això, se sospita que aquesta no és l'única manera d'activar la via de senyalització, ja que la dissociació de la subunitat α -gustoducina quan un lligand s'uneix a GCPR sembla elevar també els nivells intracel·lulars de Ca^{2+} mitjançant la hidròlisi de l'AMPc, la qual cosa torna a donar lloc a l'exocitosis dels neurotransmissors.^{260, 261} En altres localitzacions —per exemple, a l'intestí—, s'han descrit aquestes vies de senyalització per acabar amb l'alliberament d'hormones o altres mediadors de la funció paracrina.²⁶²

Receptors del gust dolços i umami (TAS1R per a humans, Tas1r per a rates)

TAS1R, que comprèn el receptor del gust de tipus 1 membre 1 (TAS1R1), 2 (TAS1R2) i 3 (TAS1R3), funcionen com a heterodímers, cadascun dels quals posseeix un gran domini extracel·lular fusionat als set dominis transmembrana.²⁶³

TAS1R2/TAS1R3 interactua amb compostos de sabor dolç com la sacarosa, la fructosa, els edulcorants artificials i certs D-aminoàcids, i provoca la sensació de sabor dolç.²⁶³ S'ha descrit la localització extraoral d'aquest receptor, que li confereix la seva implicació en diversos processos fisiològics. Per exemple, juga un paper en la secreció d'insulina, el creixement dels teixits i la regeneració dels músculs esquelètics, de manera que contribueix al processament saludable de compostos dolços.²⁶⁴ La seva participació en la secreció d'insulina pot ocórrer directament, a causa de la seva expressió en cèl·lules- β pancreàtiques, o a través de la seva implicació en l'alliberament de GLP-1, a causa de l'expressió en cèl·lules-L enteroendocrines.^{265, 266}

D'altra banda, el terme *umami* prové de la paraula japonesa *umai*, que significa 'deliciós',²⁴⁶ i s'associa amb aliments com vedella, embotits, bolets, salsa de soja, formatge curat, marisc i tomàquet.²⁶⁷ Així, l'agonista de TAS1R1/TAS1R3 incloïa L-aminoàcids, com glutamat, aspartat, alanina, serina, asparagina, arginina, histidina, treonina, glutamina i 5'-ribonucleòtids (monofosfat d'inosina 5'; IMP), i també alguns pèptids, amb L-glutamat com el principal estímul amb gust umami, que sovint es troba en la dieta com a glutamat monosòdic (MSG) i la seva forma de sal.²⁶³

Els receptors umami extraorals s'han relacionat amb la modulació de l'alliberament hormonal (per exemple, grelina i colecistoquinina), a causa de la seva ubicació estomacal i intestinal.²⁶⁸ A més, algunes evidències en suggereixen la implicació en la regulació inflammatòria i la funció intestinal.^{253, 269}

Receptors del gust amarg (TAS2R per a humans, Tas2r per a rates)

La sensació de sabor amarg pot ser desencadenada per una àmplia gamma de compostos amb diverses estructures químiques, des de sals simples fins a molècules grosses i complexes, moltes de les quals es consideren tòxiques.²⁵⁵ Els humans expressem aproximadament 26 subtipus de receptors del gust amarg, mentre que les rates expressen al voltant de 37 subtipus diferents,^{251, 270} cadascun amb una nomenclatura única, tal com van descriure prèviament Descamps-Solà *et al.*⁶ A més, cada subtipus és susceptible de ser activat per compostos amargs específics o un ampli espectre.²⁷¹ En aquest sentit, s'ha identificat una llarga llista d'agonistes específics per a alguns receptors amargs, incloent-hi compostos alimentaris com el resveratrol, el gal·lat d'epicatequina, la quinina i edulcorants artificials com l'acesulfam K i la sacarina.^{272, 273} A més, certs TAS2R han demostrat sensibilitat a pèptids i aminoàcids específics.^{274–278}

Més enllà del seu paper en la percepció del gust, la seva presència al cor, bufeta, vies respiratòries i múscul llis gastrointestinal ha apuntat una participació en la relaxació muscular i la broncodilatació.²⁶⁸ Addicionalment, TAS2R també es localitza en les cèl·lules epitelials intestinals i s'ha demostrat que participa en la regulació de la ingesta d'aliments, disminuint-la a través de canvis en la secreció hormonal.^{264, 279} A més, aquests receptors també s'han associat a mecanismes de defensa intestinal i resposta immunitària.²⁸⁰

3.3.1 Receptors intestinals del gust

S'ha descrit que els receptors del gust amarg, dolç i umami s'expressen a l'intestí i s'ha trobat que detecten una àmplia gamma de molècules endògenes i nutrients dietètics que arriben al lumen intestinal. En aquest sentit, la composició del contingut luminal intestinal varia considerablement amb la dieta, i necessita que l'epiteli intestinal detecti i respongui a aquests canvis significatius per regular les seves funcions en conseqüència.²⁸¹ Es considera que aquests receptors del gust són activats per certs nutrients i juguen un paper important en diverses activitats fisiològiques intestinals, a través de xarxes quimiosensorials similars als receptors linguals.²⁶²

Així, a l'intestí prim, es localitzen principalment a les cèl·lules enteroendocrines. Després de l'activació per lligands específics, s'ha demostrat que els receptors del gust tant de tipus 1 com de tipus 2 desencadenen l'alliberament de diverses hormones i neurotransmissors, com el pèptid similar al glucagó 1 (GLP-1),²⁸² la colecistoquinina (CCK)²⁸³ i la grelina.^{284, 285} Aquestes molècules modulen l'absorció i el metabolisme dels nutrients, la sacietat, la ingesta d'aliments, el comportament alimentari i la motilitat intestinal, de manera que mantenen l'homeòstasi en resposta als components de la dieta.^{286–288} Aquesta evidència reforça la importància de la funció intestinal en la

salut general més enllà de l'intestí. Per exemple, un mal funcionament dels receptors intestinals del gust pot provocar trastorns digestius i desencadenar obesitat, diabetis de tipus 2 i malalties gastrointestinals.^{245, 253, 289} D'altra banda, l'alteració genètica en TAS2R38 s'ha relacionat amb la disbiosi intestinal, l'alteració de la ingesta i la mala regulació de la immunitat innata, que podrien conduir a altres alteracions com la malaltia de Parkinson.²⁹⁰

D'altra banda, TAS1R i TAS2R també s'han trobat en diversos tipus cel·lulars de l'epiteli intestinal, com enteròcits, en plomall, Paneth, caliciformes i cèl·lules M; per tant, els receptors del gust intestinal estan implicats en la regulació de la funció barrera intestinal i les respostes immunitàries.^{256, 291} Les cèl·lules en plomall intestinal s'han associat recentment amb la participació en l'inici de la immunitat de tipus 2 a través de l'alliberament d'IL-25, després de l'activació del receptor intestinal del gust amarg per paràsits o microbis.²⁹² A més, Howitt *et al.* va apuntar que Tas1r3 té un paper important en la regulació de l'homeòstasi de les cèl·lules en plomall a l'intestí prim, per modular la sensibilitat als estímuls luminals durant l'expansió de la resposta immunitària de tipus 2.²⁹³ D'altra banda, la presència de TAS2R en les cèl·lules de Paneth i caliciformes va suggerir la seva participació en la producció de pèptids antimicrobians i mucus.^{280, 294}

Alguns estudis han relacionat l'alteració de TASR o les molècules de la seva cascada de senyalització amb el deteriorament intestinal i la resposta inflamatòria sistèmica. Per exemple, la colitis induïda per DSS en ratolins genoanul·lats d' α -gustducina donava lloc a **síntomes de** malaltia inflamatòria intestinal agreujats, a l'augment de la infiltració de cèl·lules immunitàries i a l'alliberament de mediadors inflamatoris respecte dels ratolins control.²⁹⁵ Per contra, un altre estudi sobre l'activació de TAS2R i la resposta metabòlica va observar una reducció de les citocines proinflamatòries que també suggeria la regulació de les respostes antiinflamatòries a través d'aquests receptors.²⁸⁷ A més, l'expressió de TAS2R en macròfags, monòcits, mastòcits, neutròfils i en limfòcits B i T ens porta a pensar en el seu paper en la immunitat innata i adaptativa.²⁵⁶ Per tant, l'activació d'aquests receptors modula la funció immunitària epitelial, la secreció de moc i la producció de pèptids antimicrobians, i influeix en la composició de la microbiota intestinal i l'homeòstasi immune, localment i més enllà del tracte gastrointestinal.²⁹⁶

3.3.2 Receptors del gust i funció immunitària

A més del tracte gastrointestinal, els receptors del gust han estat àmpliament implicats en la resposta immune en altres localitzacions. Els TAS2R s'han trobat recentment en neutròfils de sang perifèrica, monòcits i també en limfòcits en repòs i activats, i s'ha descrit que contribueix a la resposta adaptativa.²⁹⁷ De la mateixa manera, s'ha descrit

que els macròfags pulmonars humans expressen receptors del gust amarg i el tractament amb agonistes amargs suprimeixen la producció de citocines.²⁹⁸ Tant TAS1R com TAS2R s'han trobat en leucòcits circulants.²⁹⁹ Els TAS2R han estat implicats en la modulació antiinflamatòria mitjançant la regulació de l'alliberament d'IL-6, en fibroblasts gingivals humans.²⁷³ De la mateixa manera, la TAS2R gingival respon a senyals bacterians que induïxen respostes immunitàries innates de l'hoste, com la secreció d'AMP, per evitar el creixement excessiu de bacteris orals i regular la composició microbiana oral.³⁰⁰ Hollenhorst *et al.* va suggerir que la detecció del gust amarg en les cèl·lules del raspall traqueal desencadena la resposta immunitària innata a la infecció bacteriana.³⁰¹ A més, un estudi en cèl·lules de raspall uretral va demostrar que l'activació dels receptors amarg i umami condueix a l'alliberament d'acetilcolina i, en conseqüència, a l'eliminació de patògens del tracte urinari.³⁰²

D'altra banda, la inflamació aguda, però també una inflamació crònica de baix grau associada a patologies com l'obesitat, sembla alterar el sistema gustatiu. A més, el paper immunitari dels receptors del gust posa de manifest més vincles entre la immunitat i el gust.³⁰³ En obesitat, hi ha evidències considerables que suggereixen que la percepció del gust està alterada i que TAS1R, TAS2R o les molècules associades a la seva senyalització i transducció estan implicats en la regulació de l'estat inflamatori, alhora que actuen en la retroalimentació negativa per regular la ingesta de nutrients i mantenir l'homeòstasi energètica.³⁰⁴

3.3.3 Modulació de l'expressió gènica i proteica dels receptors del gust

A més de l'activació o inhibició, s'ha descrit que l'expressió dels receptors intestinals del gust pot ser modulada per la dieta i els canvis en situacions patològiques, amb conseqüències evidents per a la seva resposta fisiològica.³⁰⁵ En l'àmbit oral, l'exposició crònica a sacarosa inhibeix les respostes gustatives a concentracions més altes d'estímuls dolços, la qual cosa suggereix que un receptor pot ser sensibilitzat i desregulat després del consum crònic d'un agonista.³⁰⁶ De la mateixa manera, la sobreexposició a llarg termini a gustos apetitius, com el glutamat monosòdic o la sacarina, condueix a una desregulació dels receptors específics (TAS1R1 o TAS1R2, respectivament) en les papil·les gustatives dels animals, i així augmenta la possibilitat que la modulació dirigida als receptors del gust pugui oferir estratègies potencials per combatre l'obesitat.³⁰⁷ D'altra banda, Lin *et al.* van mostrar un augment en l'expressió gènica de Tas2r induït per la inflamació en les llengües de ratolins, que resultava en una alteració de la percepció del gust amarg i la possibilitat de més infeccions.³⁰⁸ No obstant això, aquesta modulació de l'expressió del receptor també s'ha observat en teixits extraorals, i alguns autors han investigat la modulació en l'àmbit intestinal. Per exemple, Zhang *et al.* va informar d'un augment de l'expressió d'ARNm intestinal de Tas1r2 i Tas1r3 quan les

rates consumien sacarosa i fructosa amb dieta alta en greixos o sense.³⁰⁹ Així mateix, Wang *et al.* va descriure que els humans obesos i els models animals tenen alterada l'expressió intestinal de TAS1R i TAS2R, i, consegüentment, alterada la senyalització quimiosensorial, com la secreció de grelina.³¹⁰ A més, en un model de ratolí de diabetis de tipus 2 induïda per una dieta alta en greixos i estreptozotocina, es va veure augmentada l'expressió de Tas1r3 i TRPM5 del colòn, mentre que una dieta amb quinoa com a tractament corrector va revertir aquests canvis.³¹¹

Com s'ha descrit anteriorment, la microbiota té un gran impacte en la funció intestinal. Així, s'ha proposat un concepte relativament nou en què la microbiota intestinal té un paper en la inflamació mediada pels receptors del gust. Els canvis en la microbiota podrien afectar l'expressió de les GPCR del gust i la seva cascada de senyalització, i alterar la immunitat innata i el metabolisme de l'hoste.³⁰⁴ Swartz *et al.* va demostrar una sobreexpressió del gen de la proteïna intestinal corresponent a TAS1R3 en ratolins lliures de gèrmens, associat amb una major preferència per les solucions de sacarosa.³¹² A més, s'ha descrit que els SCFA derivats de la fermentació de la microbiota influeixen en l'expressió de TAS1R.³¹³ De la mateixa manera, un altre estudi recent ha demostrat una regulació ascendent de Tas2r depenent de la microbiota en ratolins sotmesos a una dieta alta en greixos a llarg termini,³¹⁴ mentre que Latorre *et al.* va observar que el tractament amb antibiòtics pot revertir la desregulació TAS2R138 induïda per la dieta.³⁰⁵ Com que les dietes alteren la composició de la microbiota,³¹⁵ és raonable sospitar que això podria influir en l'expressió dels receptors del gust.

Totes aquestes investigacions suggereixen que l'expressió dels receptors del gust a l'intestí pot veure's afectada per compostos dietètics específics i patologies, però l'evidència continua sent limitada. Calen més estudis per explorar com diferents dietes o compostos dietètics modulen l'expressió dels receptors del gust i la potencial afectació de la funció fisiològica. Donada la importància d'un intestí sa en la prevenció de la inflamació crònica, la disfunció metabòlica i les malalties inflamatòries, i el vincle intrigant entre la funció dels receptors del gust intestinal, la integritat de la barrera intestinal i els resultats sistèmics de salut, la recerca en aquesta àrea és fonamental. Comprendre la relació entre els components de la dieta, la funció intestinal, l'expressió dels receptors del gust i les respostes sistèmiques és essencial per desenvolupar estratègies dietètiques específiques que promoguin la salut i el benestar generals.

Referències

1. ROS-BARÓ, M., et al. (2022). «Edible insect consumption for human and planetary health: a systematic review». *Int J Environ Res Public Health* 19: 11653.
2. AGUILAR-TOALÁ, J. E.; CRUZ-MONTERROSA, R. G.; LICEAGA, A. M. (2022). «Beyond human nutrition of edible insects: health benefits and safety aspects». *Insects* 13: 1007.
3. VELDHOEN, M.; BRUCKLACHER-WALDERT, V. (2012). «Dietary influences on intestinal immunity». *Nat Rev Immunol* 12: 696-708.
4. ROSENDO-SILVA, D.; VIANA, S.; CARVALHO, E.; REIS, F.; MATAFOME, P. (2023). «Are gutdysbiosis, barrier disruption, and endotoxemia related to adipose tissue dysfunction in metabolic disorders? Overview of the mechanisms involved». *Intern Emerg Med* 18: 1287.
5. AZIZ, T.; HUSSAIN, N.; HAMEED, Z.; LIN, L. (2024). «Elucidating the role of diet in maintaining gut health to reduce the risk of obesity, cardiovascular and other age-related inflammatory diseases: recent challenges and future recommendations». *Gut Microbes* 16.
6. DESCAMPS-SOLÀ, M., et al. (2023). «Bitter taste receptors along the gastrointestinal tract: comparison between humans and rodents». *Front Nutr* 10.
7. SHAHBANDI, A. A.; CHOO, E.; DANDO, R. (2018). «Receptor regulation in taste: can diet influence how we perceive foods?» *J* 1: 106-115.
8. GU, D.; ANDREEV, K.; DUPRE, M. E. (2021). «Major trends in population growth around the world». *China CDC Wkly* 3: 604.
9. CARBONE, J. W.; PASIAKOS, S. M. (2019). «Dietary protein and muscle mass: translating science to application and health benefit». *Nutrients* 11.
10. PHILLIPS, S. M.; CHEVALIER, S.; LEIDY, H. J. (2016). «“Protein requirements” beyond the RDA: implications for optimizing health». *Appl Physiol Nutr Metab* 41: 565-572.
11. WILLETT, W., et al. (2019). «Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems». *The Lancet* 393: 447-492.
12. WESTHOEK, H., et al. (2014). «Food choices, health and environment: Effects of cutting Europe’s meat and dairy intake». *Global Environmental Change* 26: 196-205.
13. SALTER, A. M. (2018). «The effects of meat consumption on global health». *Rev Sci Tech* 37: 47-55.

14. GOMEZ-ZAVAGLIA, A.; MEJUTO, J. C.; SIMAL-GANDARA, J. (2020). «Mitigation of emerging implications of climate change on food production systems». *Food Research International* 134: 109256.
15. STEINFELD, H., et al. (2006). «Livestock's long shadow». Preprint.
16. SALTER, A. M.; LOPEZ-VISO, C. (2021). «Role of novel protein sources in sustainably meeting future global requirements». *Proceedings of the Nutrition Society* 80: 186-194.
17. LAMB, A., et al. (2016). «The potential for land sparing to offset greenhouse gas emissions from agriculture». *Nature Climate Change* 6: 488-492.
18. SIJPESTIJN, G. F.; WEZEL, A.; CHRIKI, S. (2022). «Can agroecology help in meeting our 2050 protein requirements?» *Livest Sci* 256: 104822.
19. HEDENUS, F.; WIRSENIUS, S.; JOHANSSON, D. J. A. (2014). «The importance of reduced meat and dairy consumption for meeting stringent climate change targets». *Clim Change* 124: 79-91.
20. LIU, J., et al. (2023). «Perception of cultured “meat” by Italian, Portuguese and Spanish consumers». *Front Nutr* 10. 1043618.
21. THAVAMANI, A.; SFERRA, T. J.; SANKARARAMAN, S. (2020). «Meet the meat alternatives: the value of alternative protein sources». *Curr Nutr Rep* 9: 346-355.
22. FASOLIN, L. H., et al. (2019). «Emergent food proteins. Towards sustainability, health and innovation». *Food Res Int* 125.
23. BOUKID, F.; ROSELL, C. M.; ROSENE, S.; BOVER-CID, S.; CASTELLARI, M. (2022). «Non-animal proteins as cutting-edge ingredients to reformulate animal-free foodstuffs: Present status and future perspectives». *Crit Rev Food Sci Nutr* 62: 6390-6420.
24. COLGRAVE, M. L., et al. (2021). «Perspectives on future protein production». *J Agric Food Chem* 69: 15076-15083.
25. CLARK, M.; TILMAN, D. (2017). «Comparative analysis of environmental impacts of agricultural production systems, agricultural input efficiency, and food choice». *Environmental Research Letters* 12: 064016.
26. WEINDL, I., et al. (2020). «Sustainable food protein supply reconciling human and ecosystem health: a Leibniz position». *Glob Food Sec* 25: 100367.
27. LONNIE, M., et al. (2018). «Protein for life: review of optimal protein intake, sustainable dietary sources and the effect on appetite in ageing adults». *Nutrients* 10: 360 (2018).
28. DE CARVALHO, N. M.; MADUREIRA, A. R.; PINTADO, M. E. (2019). «The potential of insects as food sources – a review». <<https://doi-org.sabidi.urv.cat/10.1080/10408398.2019.1703170>> 60: 3642-3652.

29. SELALEDI, L.; MBAJIORGU, C. A.; MABELEBELE, M. (2020). «The use of yellow mealworm (*T. molitor*) as alternative source of protein in poultry diets: a review». *Trop Anim Health Prod* 52: 7-16.
30. NIKKHAH, A., et al. (2021). «Life cycle assessment of edible insects (*Protaetia brevitarsis seoulensis* larvae) as a future protein and fat source». *Sci Rep* 11: 14030.
31. HAMAM, M.; D'AMICO, M.; DI VITA, G. (2024). «Advances in the insect industry within a circular bioeconomy context: a research agenda». *Environmental Sciences Europe* 36: 1-22.
32. VAN HUIS, A. (2013). «Potential of insects as food and feed in assuring food security». <<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153704>> 58: 563-583.
33. DE CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; AGUILAR, J. G. DOS S.; DOMINGUES, M. A. F. (2018). «Nutritional, functional and biological properties of insect proteins: Processes for obtaining, consumption and future challenges». *Trends Food Sci Technol* 76: 82-89.
34. SUN-WATERHOUSE, D., et al. (2016). «Transforming insect biomass into consumer wellness foods: a review». *Food Research International* 89: 129-151.
35. SMETANA, S.; PALANISAMY, M.; MATHYS, A.; HEINZ, V. (2016). «Sustainability of insect use for feed and food: Life Cycle Assessment perspective». *J Clean Prod* 137: 741-751.
36. VAUTERIN, A.; STEINER, B.; SILLMAN, J.; KAHILUOTO, H. (2021). «The potential of insect protein to reduce food-based carbon footprints in Europe: the case of broiler meat production». *J Clean Prod* 320: 128799.
37. RAHEEM, D., et al. (2019). «Traditional consumption of and rearing edible insects in Africa, Asia and Europe». *Crit Rev Food Sci Nutr* 59: 2169-2188.
38. OLIVADESE, M.; DINDO, M. L. (2023). «Edible insects: a historical and cultural perspective on entomophagy with a focus on Western societies». *Insects* 14.
39. ANUSHA, S.; NEGI, P. S. (2022). «Edible insects and gut health», a: *Nutrition and functional foods in boosting digestion, metabolism and immune health*, p. 523-539, doi:10.1016/B978-0-12-821232-5.00015-X.
40. HUIS, A. VAN, et al. (2013). *Edible insects: future prospects for food and feed security*. FAO.
41. DE CARVALHO, N. M.; MADUREIRA, A. R.; PINTADO, M. E. (2020). «The potential of insects as food sources—a review». *Crit Rev Food Sci Nutr* 60: 3642-3652.
42. ORKUSZ, A.; WOLAŃSKA, W.; HARASYM, J.; PIWOWAR, A.; KAPELKO, M. (2020). «Consumers' attitudes facing entomophagy: Polish case perspectives».

- International Journal of Environmental Research and Public Health* 17: 2427 (2020).
43. MANCINI, S., et al. (2022). «Exploring the Future of Edible Insects in Europe». *Foods* 11: 455 (2022).
 44. JANTZEN DA SILVA LUCAS, A.; MENEGON DE OLIVEIRA, L.; DA ROCHA, M.; PRENTICE, C. (2020). «Edible insects: An alternative of nutritional, functional and bioactive compounds». *Food Chem* 311, 126022.
 45. Reglament (UE) 2015/2283 del Parlament Europeu i del Consell, de 25 de novembre de 2015, relatiu als nous aliments, pel qual es modifica el Reglament (UE) 1169/2011 del Parlament Europeu i del Consell i es deroguen el Reglament (CE) 258/97 del Parlament Europeu i del Consell i el Reglament (CE)1852/2001 de la Comissió.
 46. «Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed». *EFSA Journal* 13 (2015).
 47. TURCK, D., et al. (2021). «Safety of dried yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283». *EFSA Journal* 19.
 48. TURCK, D., et al. (2021). «Safety of frozen and dried formulations from migratory locust (*Locusta migratoria*) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283». *EFSA Journal* 19: 6667 (2021).
 49. TURCK, D., et al. (2022). «Safety of frozen and freeze-dried formulations of the lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA)». *EFSA Journal* 20: 7325.
 50. TURCK, D., et al. (2022). «Safety of partially defatted house cricket (*Acheta domesticus*) powder as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283». *EFSA Journal* 20.
 51. SOGARI, G., et al. (2023). «Review: recent advances in insect-based feeds: from animal farming to the acceptance of consumers and stakeholders». *Animal* 17: 100904.
 52. PENAZZI, L., et al. (2021). «In vivo and in vitro digestibility of an extruded complete dog food containing black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal as protein source». *Front Vet Sci* 8.
 53. VALDÉS, F., et al. (2022). «Insects as feed for companion and exotic pets: a current trend». *Animals* (Basilea) 12.
 54. DOBERMANN, D.; SWIFT, J. A.; FIELD, L. M. (2017). «Opportunities and hurdles of edible insects for food and feed». *Nutr Bull* 42: 293-308.

55. OLIVEIRA, L. A., et al. (2024). «Nutritional content, amino acid profile, and protein properties of edible insects (*Tenebrio molitor* and *Gryllus assimilis*) powders at different stages of development». *Journal of Food Composition and Analysis* 125: 105804.
56. HERMANS, W.J. H., et al. (2021). «Insects are a viable protein source for human consumption: from insect protein digestion to postprandial muscle protein synthesis in vivo in humans: a double-blind randomized trial». *Am J Clin Nutr* 114: 934-944.
57. SYAHRULAWAL, L.; TORSKE, M. O.; SAPKOTA, R.; Næss, G.; KHANAL, P. (2023). «Improving the nutritional values of yellow mealworm *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae as an animal feed ingredient: a review». *J Anim Sci Biotechnol* 14: 146.
58. KANG, Y., et al. (2023). «Yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) and lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*) proteins slowed weight gain and improved metabolism of diet-induced obesity mice». *Journal of Nutrition* 153: 2237-2248.
59. GHALY, A. E.; ALKOAİK, F. N. (2009). «The yellow mealworm as a novel source of protein». *Am J Agric Biol Sci* 4: 319-331.
60. LIU, C.; MASRI, J.; PEREZ, V.; MAYA, C.; ZHAO, J. (2020). «Growth performance and nutrient composition of mealworms (*Tenebrio molitor*) fed on fresh plant materials-supplemented diets». *Foods* 9.
61. KOZLU, A.; NGASAKUL, N.; KLOJDOVÁ, I.; BAIGTS-ALLENDE, D. K. (2024). «Edible insect-processing techniques: a strategy to develop nutritional food products and novelty food analogs». *European Food Research and Technology* 250: 1253-1267.
62. LI, L.; ZHAO, Z.; LIU, H. (2013). «Feasibility of feeding yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L.) in bioregenerative life support systems as a source of animal protein for humans». *Acta Astronaut* 92: 103-109.
63. GARINO, C., et al. (2020). «Quantitative allergenicity risk assessment of food products containing yellow mealworm (*Tenebrio molitor*)». *Food and Chemical Toxicology* 142: 111460.
64. SIEMIANOWSKA, E., et al. (2013). «Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food». *Agricultural Sciences* 4: 287-291.
65. BOVERA, F., et al. (2015). «Yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor* L.) as a possible alternative to soybean meal in broiler diets». *Br Poult Sci* 56: 569-575.
66. BOVERA, F., et al. (2016). «Use of *Tenebrio molitor* larvae meal as protein source in broiler diet: effect on growth performance, nutrient digestibility, and carcass and meat traits». *J Anim Sci* 94: 639-647.

67. IACONISI, V., et al. (2017). «Dietary inclusion of *Tenebrio molitor* larvae meal: effects on growth performance and final quality treats of blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*)». *Aquaculture* 476: 49-58.
68. GRAVEL, A.; DOYEN, A. (2020). «The use of edible insect proteins in food: challenges and issues related to their functional properties». *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 59: 102272.
69. SOETEMANS, L.; GIANOTTEN, N.; BASTIAENS, L. (2020). «Agri-food side-stream inclusion in the diet of *Alphitobius diaperinus*. Part 2: impact on larvae composition». *Insects* 11.
70. NWARU, B. I., et al. (2014). «Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis». *Allergy* 69: 992-1007.
71. BENEDÉ, S.; BLÁZQUEZ, A. B.; CHIANG, D.; TORDESILLAS, L.; BERIN, M. C. (2016). «The rise of food allergy: environmental factors and emerging treatments». *EBioMedicine* 7: 27.
72. DE MARTINIS, M.; SIRUFO, M. M.; SUPPA, M.; GINALDI, L. (2020). «New perspectives in food allergy». *Int J Mol Sci* 21.
73. PALI-SCHÖLL, I., et al. (2019). «Edible insects: cross-recognition of IgE from crustacean- and house dust mite allergic patients, and reduction of allergenicity by food processing». *World Allergy Organization Journal* 12: 100006.
74. REESE, G.; AYUSO, R.; LEHRER, S. B. (1999). «Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen». *Int Arch Allergy Immunol* 119: 247-258.
75. BINDER, M., et al. (2001). «Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen». *J Immunol* 167: 5470-5477.
76. GALINDO, P. A., et al. (2001). «A new arthropod panallergen?» *Allergy* 56: 195-197.
77. BROEKMAN, H., et al. (2016). «Majority of shrimp-allergic patients are allergic to mealworm». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137: 1261-1263.
78. VAN BROEKHOVEN, S.; BASTIAAN-NET, S.; DE JONG, N. W.; WICHERS, H. J. (2016). «Influence of processing and in vitro digestion on the allergic cross-reactivity of three mealworm species». *Food Chem* 196: 1075-1083.
79. BROEKMAN, H. C. H. P., et al. (2017). «Is mealworm or shrimp allergy indicative for food allergy to insects?». *Mol Nutr Food Res* 61.
80. CUNHA, N.; ANDRADE, V.; RUIVO, P.; PINTO, P. «Effects of insect consumption on human health: a systematic review of human studies». *Nutrients* 15.
81. KAMEMURA, N., et al. (2019). «Cross-allergenicity of crustacean and the edible insect *Gryllus bimaculatus* in patients with shrimp allergy». *Mol Immunol* 106: 127-134.

82. BEAUMONT, P.; COURTOIS, J.; VAN DER BREMPT, X.; TOLLENAERE, S. (2019). «Food-induced anaphylaxis to *Tenebrio molitor* and allergens implicated». *Rev Fr Allergol* 59: 389-393.
83. HAN, S. R., et al. (2016). «Safety assessment of freeze-dried powdered *Tenebrio molitor* larvae (yellow mealworm) as novel food source: evaluation of 90-day toxicity in Sprague-Dawley rats». *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 77: 206-212.
84. VAN BROEKHOVEN, S.; BASTIAAN-NET, S.; DE JONG, N. W.; WICHERS, H. J. (2016). «Influence of processing and in vitro digestion on the allergic cross-reactivity of three mealworm species». *Food Chem* 196: 1075-1083.
85. LAMBERTI, C., et al. (2021). «Thermal processing of insect allergens and IgE cross-recognition in Italian patients allergic to shrimp, house dust mite and mealworm». *Food Research International* 148: 110567.
86. KIM, T. K.; YONG, H. I.; KIM, Y. B.; KIM, H. W.; CHOI, Y. S. (2019). «Edible insects as a protein source: a review of public perception, processing technology, and research trends». *Food Sci Anim Resour* 39: 521.
87. BOULOS, S.; Tännler, A.; NYSTRÖM, L. (2020). «Nitrogen-to-protein conversion factors for edible insects on the Swiss market: *T. molitor*, *A. domesticus*, and *L. migratoria*». *Front Nutr* 7.
88. SOSA, D. A. T.; FOGLIANO, V. (2017). «Potential of insect-derived ingredients for food applications», a: *Insect physiology and ecology*, doi:10.5772/67318.
89. PAYNE, C. L. R.; SCARBOROUGH, P.; RAYNER, M.; NONAKA, K. (2016). «Are edible insects more or less “healthy” than commonly consumed meats? A comparison using two nutrient profiling models developed to combat over- and undernutrition». *Eur J Clin Nutr* 70: 285.
90. RUMPOLD, B. A.; SCHLÜTER, O. K. (2013). «Nutritional composition and safety aspects of edible insects». *Mol Nutr Food Res* 57: 802-823.
91. AIELLO, D., et al. (2023). «Edible insects an alternative nutritional source of bioactive compounds: a review». *Molecules* 28.
92. ACCARDO, F., et al. (2022). *Molecular composition of lipid and protein fraction of almond, beef and lesser mealworm after in vitro simulated gastrointestinal digestion and correlation with the hormone-stimulating properties of the digesta*, doi:10.1016/j.foodres.2022.111499.
93. HERNÁNDEZ-ALONSO, P.; CAMACHO-BARCIA, L.; BULLÓ, M.; SALAS-SALVADÓ, J. (2017). «Nuts and dried fruits: an update of their beneficial effects on type 2 diabetes». *Nutrients* 9.

94. VAN VLIET, S.; BURD, N. A.; VAN LOON, L. J. C. (2015). «The skeletal muscle anabolic response to plant- versus animal-based protein consumption». *J Nutr* 145: 1981-1991.
95. TUHUMURY, H. C. D. (2021). «Edible insects: Alternative protein for sustainable food and nutritional security». *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 883: 012029.
96. CHURCHWARD-VENNE, T. A.; PINCKAERS, P. J. M.; VAN LOON, J. J. A.; VAN LOON, L. J. C. (2017). «Consideration of insects as a source of dietary protein for human consumption». *Nutr Rev* 75: 1035-1045.
97. ORKUSZ, A. (2021). «Edible insects versus meat—nutritional comparison: knowledge of their composition is the key to good health». *Nutrients* 13: 1207.
98. MA, Z.; MONDOR, M.; GOYCOOLEA VALENCIA, F.; HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, A. J. (2023). «Current state of insect proteins: extraction technologies, bioactive peptides and allergenicity of edible insect proteins». *Food Funct* 14: 8129-8156.
99. MARONO, S., et al. (2015). «In vitro crude protein digestibility of tenebrio molitor and hermetia illucens insect meals and its correlation with chemical composition traits». *Ital J Anim Sci* 14: 338-343.
100. LANNG, S. K., et al. (2021). «Partial substitution of meat with insect (*Alphitobius diaperinus*) in a carnivore diet changes the gut microbiome and metabolome of healthy rats». *Foods* 10: 1814.
101. DAI, J.; LOV, J.; MARTIN-ARROWSMITH, P. W.; GRITSAS, A.; CHURCHWARD-VENNE, T. A. (2022). «The acute effects of insect vs. beef-derived protein on postprandial plasma aminoacidemia, appetite hormones, appetite sensations, and energy intake in healthy young men». *Eur J Clin Nutr* 76: 1548-1556.
102. VELDKAMP, T.; DONG, L.; PAUL, A.; GOVERS, C. (2021). «Bioactive properties of insect products for monogastric animals – a review». <<https://doi.org/10.3920/JIFF2021.0031>> 8: 1027-1040.
103. AIELLO, D., et al. (2023). «Edible insects an alternative nutritional source of bioactive compounds: a review». *Molecules* 28.
104. TORRES-CASTILLO, J. A.; Olazarán-Santibáñez, F. E. (2023). «Insects as source of phenolic and antioxidant entomochemicals in the food industry». *Front Nutr* 10, 1133342.
105. RIVAS-NAVIA, D. M., et al. «Bioactive compounds of insects for food use: potentialities and risks». *J Agric Food Res* 14: 100807.
106. TOLDRA, F.; REIG, M.; ARISTOY, M. C.; MORA, L. (2018). «Generation of bioactive peptides during food processing». *Food Chem* 267: 395-404.
107. DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. (2021): «In vivo bioactivities of food protein-derived peptides – a current review». *Curr Opin Food Sci* 39: 120-129.

108. HALL, F.; JOHNSON, P. E.; LICEAGA, A. (2018). «Effect of enzymatic hydrolysis on bioactive properties and allergenicity of cricket (*Gryllodes sigillatus*) protein». *Food Chem* 262: 39-47.
109. SARKAR, P.; VALACCHI, G.; DUARY, R. K. (2022). «Proteome composition and profiling of bioactive peptides of edible *Antheraea assamensis* pupae by sequential enzymatic digestion and kinetic modeling of in vitro gastrointestinal digestion». *European Food Research and Technology* 248: 357-379.
110. ZHAO, J. G.; WANG, H. Y.; WEI, Z. G.; ZHANG, Y. Q. (2019). «Therapeutic effects of ethanolic extract from the green cocoon shell of silkworm *Bombyx mori* on type 2 diabetic mice and its hypoglycaemic mechanism». *Toxicol Res (Cambridge)* 8: 407.
111. AHN, M. Y., et al. (2020). «Anti-diabetic activity of field cricket glycosaminoglycan by ameliorating oxidative stress». *BMC Complement Med Ther* 20: 232.
112. AHN, E. M.; MYUNG, N. Y.; JUNG, H. A.; KIM, S. J. (2019). «The ameliorative effect of *Protaetia brevitarsis* larvae in HFD-induced obese mice». *Food Sci Biotechnol* 28: 1177.
113. AHN, M. Y.; KIM, M. J.; KWON, R. H.; HWANG, J. S.; PARK, K. K. (2015). «Gene expression profiling and inhibition of adipose tissue accumulation of *G. bimaculatus* extract in rats on high fat diet». *Lipids Health Dis* 14: 1-15.
114. HAN, S. R., et al. (2014). «Evaluation of genotoxicity and 28-day oral dose toxicity on freeze-dried powder of *Tenebrio molitor* larvae (yellow mealworm)». *Toxicol Res* 30: 121.
115. GESSNER, D. K., et al. (2019). «Insect meal as alternative protein source exerts pronounced lipid-lowering effects in hyperlipidemic obese Zucker rats». *J Nutr* 149: 566-577.
116. PESSINA, F., et al. (2020). «Antihypertensive, cardio- and neuro-protective effects of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) defatted larvae in spontaneously hypertensive rats». *PLoS One* 15.
117. MIGUÉNS-GÓMEZ, A., et al. (2023). «Administration of *Alphitobius diaperinus* or *Tenebrio molitor* before meals transiently increases food intake through enterohormone regulation in female rats». *J Sci Food Agric* 103: 1660-1667.
118. NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. (2017). «Unlocking the biological potential of proteins from edible insects through enzymatic hydrolysis: a review». *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 43: 239-252.
119. SOUSA, P.; BORGES, S.; PINTADO, M. (2020). «Enzymatic hydrolysis of insect *Alphitobius diaperinus* towards the development of bioactive peptide hydrolysates». *Food Funct* 11: 3539-3548.

120. DI MATTIA, C.; BATTISTA, N.; SACCHETTI, G.; SERAFINI, M. (2019). «Antioxidant activities in vitro of water and liposoluble extracts obtained by different species of edible insects and invertebrates». *Front Nutr* 6: 438996.
121. ZIELIŃSKA, E.; PANKIEWICZ, U.; SUJKA, M. (2021). «Nutritional, physiochemical, and biological value of muffins enriched with edible insects flour». *Antioxidants* 10.
122. RIVERA-JIMÉNEZ, J., et al. (2022). «Peptides and protein hydrolysates exhibiting anti-inflammatory activity: sources, structural features and modulation mechanisms». *Food Funct* 13: 12510-12540.
123. ZIELIŃSKA, E.; BARANIAK, B.; KARAS, M. (2018). «Identification of antioxidant and anti-inflammatory peptides obtained by simulated gastrointestinal digestion of three edible insects species (*Gryllodes sigillatus*, *Tenebrio molitor*, *Schistocerca gregaria*)». *Int J Food Sci Technol* 53: 2542-2551.
124. STULL, V. J., et al. (2018). «Impact of edible cricket consumption on gut microbiota in healthy adults, a double-blind, randomized crossover trial». *Sci Rep* 8.
125. PARK, I., et al. (2020). «Protective effect of tetrahydroquinolines from the edible insect *Allomyrina dichotoma* on LPS-induced vascular inflammatory responses». *International Journal of Molecular Sciences* 21: 3406.
126. WU, Q.; PATOČKA, J.; KUČA, K. (2018). «Insect antimicrobial peptides, a mini review». *Toxins* (Basilea) 10.
127. VARTIAINEN, J., et al. (2004). «Chitosan-coated paper: effects of nisin and different acids on the antimicrobial activity». *J Appl Polym Sci* 94: 986-993.
128. HWANG, B. B., et al. (2019). «The edible insect *Gryllus bimaculatus* protects against gut-derived inflammatory responses and liver damage in mice after acute alcohol exposure». *Nutrients* 11.
129. PARK, B. M.; JUNG, B. G.; LEE, J. A.; LEE, B. J. (2023). «Mitigating effects of *Tenebrio molitor* larvae powder administration in mice with dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis». *Asian Pac J Cancer Prev* 24: 1751.
130. HABTE-TSION, H. M., et al. (2024). «Effects of fishmeal substitution with mealworm meals (*Tenebrio molitor* and *Alphitobius diaperinus*) on the growth, physiobiochemical response, digesta microbiome, and immune genes expression of Atlantic salmon (*Salmo salar*)». *Aquac Nutr* 2024.
131. GE, C., et al. (2023). «Yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) enhances intestinal immunity in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) via the NF- κ B/survivin signaling pathway». *Fish Shellfish Immunol* 136: 108736.
132. YOUNG, W., et al. (2020). «Feeding bugs to bugs: edible insects modify the human gut microbiome in an in vitro fermentation model». *Front Microbiol* 11: 505515.

133. COLOMBINO, E., *et al.* (2021). «Effect of insect live larvae as environmental enrichment on poultry gut health: gut mucin composition, microbiota and local immune response evaluation». *Animals* 11: 2819.
134. DE SANTIS, S.; CAVALCANTI, E.; MASTRONARDI, M.; JIRILLO, E.; CHIEPPA, M. (2015). «Nutritional keys for intestinal barrier modulation». *Front Immunol* 6: 1.
135. BOLAND, M. (2016). «Human digestion—a processing perspective». *J Sci Food Agric* 96: 2275-2283.
136. LENCER, W. I. (2001). «Microbial invasion across the intestinal epithelial barrier: commentary on the article by Burns *et al.* on page 30». *Pediatric Research* 49: 4-5.
137. KIELA, P. R.; GHISHAN, F. K. (2016). «Physiology of intestinal absorption and secretion». *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 30: 145.
138. WACHSMUTH, H. R.; WENINGER, S. N.; DUCA, F. A. (2022). «Role of the gut–brain axis in energy and glucose metabolism». *Experimental & Molecular Medicine* 54: 377-392.
139. FLEMING, M. A.; EHSAN, L.; MOORE, S. R.; LEVIN, D. E. (2020). «The enteric nervous system and its emerging role as a therapeutic target». *Gastroenterol Res Pract* 2020.
140. FRANCESCANGELI, F.; DE ANGELIS, M. L.; ZEUNER, A. (2019). «Dietary factors in the control of gut homeostasis, intestinal stem cells, and colorectal cancer». *Nutrients* 11.
141. LI, B.; CHEN, Y. C. (2023). «Functional food ingredients and intestinal homeostasis». *Front Nutr* 10, 1243424.
142. HICKEY, J. W., *et al.* «Organization of the human intestine at single-cell resolution». *Nature* 619: 572-584.
143. GIL CARDOSO, K. (2018). «Grape seed proanthocyanidins as modulators of the inflammatory response and barrier function in the intestine». *TDX* (Tesis Doctorals en Xarxa).
144. OGOBUIRO, I.; GONZALES, J.; SHUMWAY, K. R.; TUMA, F. (2023). «Physiology, gastrointestinal». *StatPearls*.
145. MARSHMAN, E.; BOOTH, C.; POTTEN, C. S. (2002). «The intestinal epithelial stem cell». *BioEssays* 24: 91-98.
146. HELANDER, H. F.; Fändriks, L. (2014). «Surface area of the digestive tract – revisited». *Scand J Gastroenterol* 49: 681-689.
147. SALONEN, A.; DE VOS, W. M. (2014). «Impact of Diet on Human Intestinal Microbiota and Health». <<https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182554>> 5: 239-262.

148. CLEVERS, H. (2013). «The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment». *Cell* 154: 274.
149. BURCLAFF, J. et al. (2022) «A proximal-to-distal survey of healthy adult human small intestine and colon epithelium by single-cell transcriptomics», *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 13(5): 1554–1589.
150. ZHANG, P. (2022). «Influence of foods and nutrition on the gut microbiome and implications for intestinal health». *Int J Mol Sci* 23: 23.
151. BOWCUTT, R., et al. (2014). «Heterogeneity across the murine small and large intestine». *World Journal of Gastroenterology* 20: 15216.
152. PELASEYED, T. et al. (2014). «The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system». *Immunol Rev* 260: 8.
153. SCHNEIDER, C.; O'Leary, C. E.; Locksley, R. M. (2019). «Regulation of immune responses by tuft cells». *Nature Reviews Immunology* 19: 584-593.
154. JUNG, C.; HUGOT, J.-P.; BARREAU, F. (2010). «Peyer's patches: the immune sensors of the intestine». *Int J Inflam* 2010: 1-12.
155. GERBE, F.; JAY, P. (2016). «Intestinal tuft cells: epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system». *Mucosal Immunology* 9: 1353-1359.
156. KELSALL, B. (2008). «Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages». *Mucosal Immunology* 1: 460-469.
157. CEROVIC, V.; BAIN, C. C.; MOWAT, A. M.; MILLING, S. W. F. (2014). «Intestinal macrophages and dendritic cells: what's the difference?». *Trends Immunol* 35: 270-277.
158. AROSA, L.; CAMBA-GÓMEZ, M.; CONDE-ARANDA, J. (2022). «Neutrophils in intestinal inflammation: what we know and what we could expect for the near future». *Gastrointestinal Disorders* 4: 263-276.
159. SALVO-ROMERO, E., et al. (2022). «Eosinophils in the gastrointestinal tract: key contributors to neuro-immune crosstalk and potential implications in disorders of brain-gut interaction». *Cells* 11: 1644.
160. GURTNER, A. et al. (2022). «Active eosinophils regulate host defence and immune responses in colitis». *Nature* 615: 151-157.
161. GALLI, S. J.; NAKAE, S.; TSAI, M. (2005). «Mast cells in the development of adaptive immune responses». *Nature Immunology* 6: 135-142.
162. ZHENG, D.; LIWINSKI, T.; ELINAV, E. (2020). «Interaction between microbiota and immunity in health and disease». *Cell Research* 30: 492-506.

163. PETERSON, L. W.; ARTIS, D. (2014). «Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis». *Nature Reviews Immunology* 14: 141-153.
164. LOZUPONE, C. A.; STOMBAUGH, J. I.; GORDON, J. I.; JANSSON, J. K.; KNIGHT, R. (2012). «Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota». *Nature* 489: 220-230.
165. LAUDER, A. P., et al. (2016). «Comparison of placenta samples with contamination controls does not provide evidence for a distinct placenta microbiota». *Microbiome* 4: 1-11.
166. PEREZ-MUÑOZ, M. E.; ARRIETA, M. C.; RAMER-TAIT, A. E.; WALTER, J. (2017). «A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome». *Microbiome* 5: 1-19.
167. MILANI, C., et al. (2017). «The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 81.
168. URSELL, L. K., et al. (2012). «The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites». *J Allergy Clin Immunol* 129: 1204-1208.
169. MILLER, B. M.; LIOU, M. J.; LEE, J. Y.; Bäumlér, A. J. (2021). «The longitudinal and cross-sectional heterogeneity of the intestinal microbiota». *Curr Opin Microbiol* 63: 221-230.
170. CANI, P. D., et al. (2019). «Microbial regulation of organismal energy homeostasis». *Nature Metabolism* 1: 34-46.
171. POSTLER, T. S.; GHOSH, S. (2017). «Understanding the holobiont: how microbial metabolites affect human health and shape the immune system». *Cell Metab* 26: 110-130.
172. VERBEKE, K. A., et al. (2015). «Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics». *Nutr Res Rev* 28: 42.
173. ROOKS, M. G.; GARRETT, W. S. (2016). «Gut microbiota, metabolites and host immunity». *Nat Rev Immunol* 16: 341.
174. KALINA, U., et al. (2002). «Enhanced production of IL-18 in butyrate-treated intestinal epithelium by stimulation of the proximal promoter region», doi:10.1002/1521-4141.
175. MACPHERSON, A. J., et al. (2000). «A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria». *Science* (1979) 288: 2222-2226.

176. DE SANTIS, S.; CAVALCANTI, E.; MASTRONARDI, M.; JIRILLO, E.; CHIEPPA, M. (2015). «Nutritional keys for intestinal barrier modulation». *Front Immunol* 6: 167739.
177. SCOTT, N. A.; MANN, E. R. (2020). «Regulation of mononuclear phagocyte function by the microbiota at mucosal sites». *Immunology* 159: 26.
178. PAONE, P.; CANI, P. D. (2020). «Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners?» *Gut* 69: 2232.
179. KANG, Y.; PARK, H.; CHOE, B. H.; KANG, B. (2022). «The role and function of mucins and its relationship to inflammatory bowel disease». *Front Med (Lausana)* 9: 848344.
180. DE MEDINA, F. S.; ROMERO-CALVO, I.; MASCARAQUE, C.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O. (2014). «Intestinal inflammation and mucosal barrier function». *Inflamm Bowel Dis* 20: 2394-2404.
181. ARIKE, L.; HANSSON, G. C. (2016). «The densely O-glycosylated MUC2 mucin protects the intestine and provides food for the commensal bacteria». *J Mol Biol* 428: 3221.
182. ALI, A.; TAN, H. Y.; KAIKO, G. E. (2020). «Role of the intestinal epithelium and its interaction with the microbiota in food allergy». *Front Immunol* 11.
183. CAMILLERI, M., et al. (2019). «Role for diet in normal gut barrier function: developing guidance within the framework of food-labeling regulations». *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 317: G17.
184. IVANOV, A. I. (2013). «Structure and regulation of intestinal epithelial tight junctions current concepts and unanswered questions». *Adv Exp Med Biol* 763: 132-148.
185. GIERYŃSKA, M.; SZULC-DĄBROWSKA, L.; STRUZIŁ, J.; MIELCARSKA, M. B.; GREGORCZYK-ZBOROCH, K. P. (2022). «Integrity of the intestinal barrier: the involvement of epithelial cells and microbiota—a mutual relationship». *Animals (Basilea)* 12.
186. OHNO, H. (2016). «Intestinal M cells». *J Biochem* 159: 151.
187. KAVATHAS, P. B.; KRAUSE, P. J.; RUDDLE, N. H. (2019). «Innate immunity: recognition and effector functions», a: *Immunoepidemiology*, p. 39-53, doi:10.1007/978-3-030-25553-4_3.
188. BRANDTZAEG, P.; KIYONO, H.; PABST, R.; RUSSELL, M. W. (2007). «Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue». *Mucosal Immunology* 1: 31-37.
189. CESTA, M. F. (2016). «Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue». <<http://dx.doi.org/sabidi.urv.cat/10.1080/01926230600865531>> 34: 599-608.

190. RESCIGNO, M., *et al.* (2001). «Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria». *Nature Immunology* 2: 361-367.
191. STAGG, A. J. (2018). «Intestinal dendritic cells in health and gut inflammation». *Front Immunol* 9: 2883.
192. KAYAMA, H.; TAKEDA, K. (2016). «Functions of innate immune cells and commensal bacteria in gut homeostasis». *J Biochem* 159: 141.
193. BRANDTZAEG, P.; PABST, R. (2004). «Let's go mucosal: communication on slippery ground». *Trends Immunol* 25: 570-577.
194. WEI, H.; WANG, J. Y. (2021). «Role of polymeric immunoglobulin receptor in IgA and IgM transcytosis». *Int J Mol Sci* 22: 1-20.
195. PIETRZAK, B.; TOMELA, K.; OLEJNIK-SCHMIDT, A.; MACKIEWICZ, A.; SCHMIDT, M. (2020). «Secretory IgA in intestinal mucosal secretions as an adaptive barrier against microbial cells». *Int J Mol Sci* 21: 1-15.
196. TAKIISHI, T.; FENERO, C. I. M.; Câmara, N. O. S. (2017). «Intestinal barrier and gut microbiota: shaping our immune responses throughout life». *Tissue Barriers* 5.
197. RESCIGNO, M. (2011). «The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity». *Trends Immunol* 32: 256-264.
198. ALONSO, C.; VICARIO, M.; SANTOS, J.; AZPIROZ, F. «Stress, intestinal inflammation, and irritable bowel syndrome affiliations». *Ann Gastroentol Hepatol* 10.
199. GHOSH, S. S.; WANG, J.; YANNIE, P. J.; GHOSH, S. (2020). «Intestinal barrier dysfunction, LPS translocation, and disease development». *J Endocr Soc* 4.
200. TEIXEIRA, T. F. S.; COLLADO, M. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; BRESSAN, J.; PELUZIO, M. DO C. G. (2012). «Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability». *Nutrition Research* 32: 637-647.
201. SCHLEIMER, R. P.; KATO, A.; KERN, R.; KUPERMAN, D.; AVILA, P. C. (2007). «Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses». *J Allergy Clin Immunol* 120: 1279.
202. KREMPSKI, J. W.; DANT, C.; NADEAU, K. C. (2020). «The origins of allergy from a systems approach». *Ann Allergy Asthma Immunol* 125: 507-516.
203. GONZÁLEZ-QUILEN, C., *et al.* (2019). «Grape-seed proanthocyanidins are able to reverse intestinal dysfunction and metabolic endotoxemia induced by a cafeteria diet in Wistar rats». *Nutrients* 11.
204. HOU, K., *et al.* (2022). «Microbiota in health and diseases». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7: 1-28.

205. LALANZA, J. F.; SNOEREN, E. M. S. (2021). «The cafeteria diet: a standardized protocol and its effects on behavior». *Neurosci Biobehav Rev* 122: 92-119.
206. MARINÉ-CASADÓ, R., et al. (2018). «Intake of an obesogenic cafeteria diet affects body weight, feeding behavior, and glucose and lipid metabolism in a photoperiod-dependent manner in F344 rats». *Front Physiol* 9: 419244.
207. DE LA GARZA, A. L., et al. (2022). «Characterization of the cafeteria diet as simulation of the human western diet and its impact on the lipidomic profile and gut microbiota in obese rats». *Nutrients* 15: 86.
208. SONNENBURG, E. D., et al. (2016). «Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations». *Nature* 529: 212-215.
209. GUO, Y., et al. (2021). «A diet high in sugar and fat influences neurotransmitter metabolism and then affects brain function by altering the gut microbiota». *Translational Psychiatry* 11: 1-27.
210. FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; MORENO, L. O.; CHAPARRO, M.; GISBERT, J. P. (2021). «Gut microbiota and dietary factors as modulators of the mucus layer in inflammatory bowel disease». *International Journal of Molecular Sciences* 22: 10224.
211. JAMAR, G.; RIBEIRO, D. A.; PISANI, L. P. (2021). «High-fat or high-sugar diets as trigger inflammation in the microbiota-gut-brain axis». *Crit Rev Food Sci Nutr* 61: 836-854.
212. ANDRÉ, P.; LAUGERETTE, F.; Féart, C. (2019). «Metabolic endotoxemia: a potential underlying mechanism of the relationship between dietary fat intake and risk for cognitive impairments in humans?» *Nutrients* 11.
213. GIL-CARDOSO, K., et al. (2017). «A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats». *British Journal of Nutrition* 117: 218-229.
214. BELKAID, Y.; HARRISON, O. J. (2017). «Homeostatic immunity and the microbiota». *Immunity* 46: 562.
215. GUERVILLE, M.; BOUDRY, G. (2016). «Gastrointestinal and hepatic mechanisms limiting entry and dissemination of lipopolysaccharide into the systemic circulation». *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 311: G1-G15.
216. GONZÁLEZ-QUILEN, C., et al. (2021). «Protective properties of grape-seed proanthocyanidins in human ex vivo acute colonic dysfunction induced by dextran sodium sulfate». *Eur J Nutr* 60: 79-88.
217. OGIKUBO, Y., et al. (2004). «Effect of lipopolysaccharide (LPS) injection on the immune responses of LPS-sensitive mice». *J. Vet. Med. Sci* 66: 1189-1193.
218. GIL-CARDOSO, K., et al. (2019). «Protective effect of proanthocyanidins in a rat model of mild intestinal inflammation and impaired intestinal permeability induced by LPS». *Mol Nutr Food Res* 63.

219. RAMÍREZ, K.; Quesada-Yamasaki, D.; Fornaguera-Trías, J. (2019). «A protocol to perform systemic lipopolysaccharide (LPS) challenge in rats». *Odovtos - International Journal of Dental Sciences* 21: 53-66.
220. MOHAMMAD, S.; THIEMERMANN, C. (2020). «role of metabolic endotoxemia in systemic inflammation and potential interventions». *Front Immunol* 11.
221. BERNALDO DE QUIROS, E.; SEOANE-REULA, E.; ALONSO-LEBRERO, E.; PION, M.; CORREA-ROCHA, R. (2018). «The role of regulatory T cells in the acquisition of tolerance to food allergens in children». *Allergol Immunopathol (Madrid)* 46: 612-618.
222. ISHIHARA, N., *et al.* (2022). «Spi-B alleviates food allergy by securing mucosal barrier and immune tolerance in the intestine». *Frontiers in Allergy* 3: 996657.
223. MORITA, H.; SAITO, H.; MATSUMOTO, K.; NAKAE, S. (2016). «Regulatory roles of mast cells in immune responses». *Semin Immunopathol* 38: 623-629.
224. YU, W.; HUSSEY FREELAND, D. M.; NADEAU, K. C. (2017). «Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy» *HHS Public Access*, doi:10.1038/nri.2016.111.
225. DRØNEN, E. K.; NAMORK, E.; DIRVEN, H.; NYGAARD, U. C. (2022). «Suspected gut barrier disruptors and development of food allergy: Adjuvant effects and early immune responses». *Frontiers in Allergy* 3.
226. SAMADI, N.; KLEMS, M.; UNTERSMAIR, E. (2018). «The role of gastrointestinal permeability in food allergy». *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 121: 168-173.
227. ALI, A.; TAN, H. Y.; KAIKO, G. E. (2020). «Role of the intestinal epithelium and its interaction with the microbiota in food allergy». *Front Immunol* 11.
228. GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. (2008). «The development of allergic inflammation». *Nature* 454: 445-454.
229. YU, L. C.-H. (2012). «Intestinal epithelial barrier dysfunction in food hypersensitivity». *J Allergy (el Caire)* 2012: 1-11.
230. POWELL, N.; WALKER, M. M.; TALLEY, N. J. (2017). «The mucosal immune system: master regulator of bidirectional gut-brain Communications». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 14: 143-159.
231. PAUL, W. E.; ZHU, J. (2010). «How are TH2-type immune responses initiated and amplified?». *Nat Rev Immunol* 10: 225.
232. FAN, J., *et al.* (2022). «The effects and cell barrier mechanism of main dietary nutrients on intestinal barrier». *Curr Opin Food Sci* 48: 100942.
233. AYAKDAŞ, G.; Ağagündüz, D. (2023). «Microbiota-accessible carbohydrates (MACs) as novel gut microbiome modulators in noncommunicable diseases». *Heliyon* 9: e19888.

234. HOU, K., *et al.* (2022). «Microbiota in health and diseases». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7: 1-28.
235. ANSARI, F., *et al.* (2023). «The role of probiotics and prebiotics in modulating of the gut-brain axis». *Front Nutr* 10: 1173660.
236. KHOSHBIN, K.; CAMILLERI, M. (2020). «Effects of dietary components on intestinal permeability in health and disease». *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 319: G589.
237. LOPEZ-SANTAMARINA, A., *et al.* (2020). «Animal-origin prebiotics based on chitin: an alternative for the future? A critical review». *Foods* 9.
238. MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; RIVERO-GUTIÉRREZ, B.; MASCARAQUE, C.; DE MEDINA, F. S. (2014). «Food derived bioactive peptides and intestinal barrier function». *Int J Mol Sci* 15: 22857.
239. BAO, X.; WU, J. (2021). «Impact of food-derived bioactive peptides on gut function and health». *Food Res Int* 147.
240. JI, F. J.; WANG, L. X.; YANG, H. S.; HU, A.; YIN, Y. L. (2019). «Review: the roles and functions of glutamine on intestinal health and performance of weaning pigs». *Animal* 13: 2727-2735.
241. SUZUKI, T.; HARA, H. (2009). «Quercetin enhances intestinal barrier function through the assembly of zonula [corrected] occludens-2, occludin, and claudin-1 and the expression of claudin-4 in Caco-2 cells». *J Nutr* 139: 965-974.
242. CHEN, K., *et al.* (2020). «Effect of resveratrol on intestinal tight junction proteins and the gut microbiome in high-fat diet-fed insulin resistant mice». *Int J Food Sci Nutr* 71: 965-978.
243. DURKIN, L. A.; CHILDS, C. E.; CALDER, P. C. (2021). «Omega-3 polyunsaturated fatty acids and the intestinal epithelium—a review». *Foods* 10: 199.
244. JERUZAL-ŚWIĄTECKA, J.; FENDLER, W.; PIETRUSZEWSKA, W. (2020). «Clinical role of extraoral bitter taste receptors». *Int J Mol Sci* 21: 1-23.
245. XIE, F., *et al.* (2023). «Sensation of dietary nutrients by gut taste receptors and its mechanisms». *Crit Rev Food Sci Nutr* 63: 5594-5607.
246. BACHMANOV, A. A., *et al.* (2014). «Genetics of taste receptors». *Curr Pharm Des* 20: 2669.
247. CHAO, D. H. M., *et al.* (2016). «Impact of obesity on taste receptor expression in extra-oral tissues: emphasis on hypothalamus and brainstem». *Sci Rep* 6.
248. JALŠEVAC, F., *et al.* (2022). «The hidden one: what we know about bitter taste receptor 39». *Front Endocrinol (Lausana)* 13.
249. TENG, B., *et al.* (2019). «Cellular and neural responses to sour stimuli require the proton channel Otop1». *Curr Biol* 29: 3647.

250. CHANDRASHEKAR, J., et al. (2010). «The cells and peripheral representation of sodium taste in mice». *Nature* 464: 297.
251. GRAU-BOVÉ, C., et al. (2022). «Functional and genomic comparative study of the bitter taste receptor family TAS2R: insight into the role of human TAS2R5». *The FASEB Journal* 36: e22175.
252. BACHMANOV, A. A.; BEAUCHAMP, G. K. (2007). «Taste receptor genes». *Annu Rev Nutr* 27: 389.
253. SHON, W. J., et al. (2023). «Gut taste receptor type 1 member 3 is an intrinsic regulator of Western diet-induced intestinal inflammation». *BMC Med* 21: 1-22.
254. CHELED-SHOVAL, S. L.; DRUYAN, S.; UNI, Z. (2015). «Bitter, sweet and umami taste receptors and downstream signaling effectors: expression in embryonic and growing chicken gastrointestinal tract». *Poult Sci* 94: 1928-1941.
255. ROPER, S. D.; CHAUDHARI, N. (2017). «Taste buds: cells, signals and synapses». *Nat Rev Neurosci* 18: 485.
256. KAMILA, T.; AGNIESZKA, K. (2021). «An update on extra-oral bitter taste receptors». *J Transl Med* 19: 440.
257. ZHANG, Y., et al. (2003). «Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways». *Cell* 112: 293-301.
258. ZHANG, Z.; ZHAO, Z.; MARGOLSKEE, R.; LIMAN, E. (2007). «The transduction channel TRPM5 is gated by intracellular calcium in taste cells». *The Journal of Neuroscience* 27: 5777.
259. TARUNO, A., et al. (2013). «CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes». *Nature* 495: 223.
260. McLAUGHLIN, S. K.; McKINNON, P. J.; MARGOLSKEE, R. F. (1992). «Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins». *Nature* 357: 563-569.
261. McMAHON, D. B., et al. (2023). «Savory Signaling: T1R umami receptor modulates endoplasmic reticulum calcium store content and release dynamics in airway epithelial cells». *Nutrients* 15.
262. BEHRENS, M.; LANG, T. (2022). «Extra-oral taste receptors—function, disease, and perspectives». *Front Nutr* 9: 881177.
263. AHMAD, R.; DALZIEL, J. E. (2020). «G protein-coupled receptors in taste physiology and pharmacology». *Front Pharmacol* 11.
264. GILCA, M.; DRAGOS, D. (2017). «Extraoral taste receptor discovery: new light on ayurvedic pharmacology». *Evid Based Complement Alternat Med* 2017.
265. JANG, H. J., et al. (2007). «Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1». *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15069.

266. NAKAGAWA, Y., *et al.* (2009). «Sweet taste receptor expressed in pancreatic β -cells activates the calcium and cyclic amp signaling systems and stimulates insulin secretion». *PLoS One* 4.
267. HARTLEY, I. E.; LIEM, D. G.; KEAST, R. (2019). «Umami as an “alimentary” taste. A new perspective on taste classification». *Nutrients* 11.
268. SERVANT, G.; FREROT, E. (2021). «Pharmacology of the umami taste receptor». *Handb Exp Pharmacol* 275: 109-136.
269. KENDIG, D. M., *et al.* (2014). «Activation of the umami taste receptor (T1R1/T1R3) initiates the peristaltic reflex and pellet propulsion in the distal colon». *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307: G1100.
270. SMAIL, H. O. (2019). «The roles of genes in the bitter taste». *AIMS Genet* 6: 88.
271. LANG, T.; DI PIZIO, A.; RISSO, D.; DRAYNA, D.; BEHRENS, M. (2023). «Activation profile of TAS2R2, the 26th human bitter taste receptor». *Mol Nutr Food Res* 67: 2200775.
272. WOODING, S. P.; RAMIREZ, V. A.; BEHRENS, M. (2021). «Bitter taste receptors: genes, evolution and health». *Evol Med Public Health* 9: 431-447.
273. TIROCH, J., *et al.* (2023). «Human gingival fibroblasts as a novel cell model describing the association between bitter taste thresholds and interleukin-6 release». *J Agric Food Chem* 71: 5314-5325.
274. RICHTER, P., *et al.* (2022). «Bitter peptides YFYPEL, VAPFPEVF, and YQEPVLGPVRGPFPIIV, released during gastric digestion of casein, stimulate mechanisms of gastric acid secretion via bitter taste receptors TAS2R16 and TAS2R38». *J. Agric. Food Chem* 2022: 11591-11602.
275. KIM, M. J.; SON, H. J.; KIM, Y.; MISAKA, T.; RHYU, M.-R. (2015). «Umami-bitter interactions: the suppression of bitterness by umami peptides via human bitter taste receptor». *Biochem Biophys Res Commun* 456: 586-590.
276. MAEHASHI, K.; HUANG, L. (2009). «Bitter peptides and bitter taste receptors». *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 1661-1671.
277. KARAMEZSI, K.; KOKKINIDOU, S.; RONNINGEN, I.; PETERSON, D. G. (2014). «Identification of bitter peptides in aged cheddar cheese». *J Agric Food Chem* 62: 8034-8041.
278. KOHL, S.; BEHRENS, M.; DUNKEL, A.; HOFMANN, T.; MEYERHOF, W. (2013). «Amino acids and peptides activate at least five members of the human bitter taste receptor family». *J Agric Food Chem* 61: 53-60.
279. MENNELLA, I., *et al.* (2016). «Microencapsulated bitter compounds (from *Gentiana lutea*) reduce daily energy intakes in humans». *British Journal of Nutrition* 116: 1841-1850.

280. PRANDI, S., *et al.* (2013). «A subset of mouse colonic goblet cells expresses the bitter taste receptor Tas2r131». *PLoS One* 8.
281. DYER, J.; SALMON, K. S. H.; ZIBRIK, L.; SHIRAZI-BEECHEY, S. P. (2005). «Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells». *Biochem Soc Trans* 33: 302-305.
282. OYA, M., *et al.* (2013). «The G protein-coupled receptor family C group 6 subtype A (GPRC6A) receptor is involved in amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells». *J Biol Chem* 288: 4513.
283. DALY, K., *et al.* (2013). «Sensing of amino acids by the gut-expressed taste receptor T1R1-T1R3 stimulates CCK secretion». *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304: G271.
284. VANCLEEF, L., *et al.* (2015). «Chemosensory signalling pathways involved in sensing of amino acids by the ghrelin cell». *Scientific Reports* 5: 1-14.
285. JANSSEN, S., *et al.* (2011). «Bitter taste receptors and α -gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying». *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 2094-2099.
286. WANG, J. H., *et al.* (2011). «Umami receptor activation increases duodenal bicarbonate secretion via glucagon-like peptide-2 release in rats». *J Pharmacol Exp Ther* 339: 464.
287. KOK, B. P., *et al.* (2018). «Intestinal bitter taste receptor activation alters hormone secretion and imparts metabolic benefits». *Mol Metab* 16: 76-87.
288. WANG, Y., *et al.* (2023). «The gut odorant receptor and taste receptor make sense of dietary components: a focus on gut hormone secretion». *Crit Rev Food Sci Nutr*, doi:10.1080/10408398.2023.2177610.
289. LISZT, K. I., *et al.* (2022). «Human intestinal bitter taste receptors regulate innate immune responses and metabolic regulators in obesity». *J Clin Invest* 132.
290. VASCELLARI, S., *et al.* (2020). «Genetic variants of TAS2R38 bitter taste receptor associate with distinct gut microbiota traits in Parkinson's disease: a pilot study». *Int J Biol Macromol* 165: 665-674.
291. KI, S. Y.; JEONG, Y. T. (2022). «Taste receptors beyond taste buds». *Int J Mol Sci* 23: 9677.
292. LUO, X. C., *et al.* (2019). «Infection by the parasitic helminth *Trichinella spiralis* activates a Tas2r-mediated signaling pathway in intestinal tuft cells». *Proc Natl Acad Sci USA* 116: 5564-5569.
293. HOWITT, M. R., *et al.* (2020). «The taste receptor TAS1R3 regulates small intestinal tuft cell homeostasis». *Immunohorizons* 4: 23.

294. PRANDI, S.; VOIGT, A.; MEYERHOF, W.; BEHRENS, M. (2017). «Expression profiling of Tas2r genes reveals a complex pattern along the mouse GI tract and the presence of Tas2r131 in a subset of intestinal Paneth cells». *Cellular and Molecular Life Sciences* 75: 49-65.
295. FENG, P., et al. (2018). «Aggravated gut inflammation in mice lacking the taste signaling protein α -gustducin». *Brain Behav Immun* 71: 23.
296. TURNER, A., et al. (2019). «Interactions between taste receptors and the gastrointestinal microbiome in inflammatory bowel disease». *J Nutr Intermed Metab* 18: 100106.
297. TRAN, H. T. T.; HERZ, C.; RUF, P.; STETTER, R.; LAMY, E. (2018). «Human T2R38 bitter taste receptor expression in resting and activated lymphocytes». *Front Immunol* 9: 418485.
298. GRASSIN-DELYLE, S., et al. (2019). «Bitter Taste Receptors (TAS2Rs) in human lung macrophages: receptor expression and inhibitory effects of TAS2R agonists». *Front Physiol* 10.
299. MALKI, A., et al. (2015). «Class I odorant receptors, TAS1R and TAS2R taste receptors, are markers for subpopulations of circulating leukocytes». *J Leukoc Biol* 97: 533-545.
300. ZHENG, X., et al. (2019). «Gingival solitary chemosensory cells are immune sentinels for periodontitis». *Nat Commun* 10.
301. HOLLENHORST, M. I., et al. (2022). «Bitter taste signaling in tracheal epithelial brush cells elicits innate immune responses to bacterial infection». *J Clin Invest* 132.
302. DECKMANN, K., et al. (2014). «Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes». *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 8287-8292.
303. GOODMAN, J. R.; DANDO, R. (2021). «To detect and reject, parallel roles for taste and immunity». *Curr Nutr Rep* 10: 137.
304. KOH, G. Y.; ROWLING, M. J.; PRITCHARD, S. K. (2022). «Possible role of type 1 and type 2 taste receptors on obesity-induced inflammation». *Nutr Rev* 80: 1919-1926.
305. LATORRE, R., et al. (2016). «Expression of the bitter taste receptor, T2R38, in enteroendocrine cells of the colonic mucosa of overweight/obese vs. lean subjects». *PLoS One* 11.
306. MCCLUSKEY, L. P.; HE, L.; DONG, G.; HARRIS, R. (2020). «Chronic exposure to liquid sucrose and dry sucrose diet have differential effects on peripheral taste responses in female rats». *Appetite* 145: 104499.

- 307. ARCHER, N., *et al.* (2019). «Obesity is associated with altered gene expression in human tastebuds». *International Journal of Obesity* 43: 1475-1484.
- 308. LIN, C., *et al.* (2023). «Lipopolysaccharide increases bitter taste sensitivity via epigenetic changes in Tas2r gene clusters». *iScience* 26: 106920.
- 309. ZHANG, Y., *et al.* (2023). «Nutritive/non-nutritive sweeteners and high fat diet contribute to dysregulation of sweet taste receptors and metabolic derangements in oral, intestinal and central nervous tissues». *Eur J Nutr* 62: 3149-3159.
- 310. WANG, Q., *et al.* (2019). «Obesity alters adrenergic and chemosensory signaling pathways that regulate ghrelin secretion in the human gut». *FASEB Journal* 33: 4907-4920.
- 311. ZHENG, C. Y., *et al.* (2023). «Revealing the mechanism of quinoa on type 2 diabetes based on intestinal flora and taste pathways». *Food Sci Nutr* 11: 7930.
- 312. SWARTZ, T. D.; DUCA, F. A.; DE WOUTERS, T.; SAKAR, Y.; COVASA, M. (2012). «Up-regulation of intestinal type 1 taste receptor 3 and sodium glucose luminal transporter-1 expression and increased sucrose intake in mice lacking gut microbiota». *Br J Nutr* 107: 621-630.
- 313. SHACKLEY, M., *et al.* (2020). «Short chain fatty acids enhance expression and activity of the umami taste receptor in enteroendocrine cells via a Gαi/o pathway». *Front Nutr* 7: 568991.
- 314. CAREMOLI, F., *et al.* (2023). «Microbiota-dependent upregulation of bitter taste receptor subtypes in the mouse large intestine in high-fat diet-induced obesity». *Nutrients* 15.
- 315. FUKE, N.; NAGATA, N.; SUGANUMA, H.; OTA, T. (2019). «Regulation of gut microbiota and metabolic endotoxemia with dietary factors». *Nutrients* 11: 2277.

Hipòtesi i objectius

Donat el ràpid creixement de la població mundial i les creixents preocupacions ambientals, la recerca de fonts de proteïnes sostenibles és urgent i necessària. Els insectes han sorgit com una font de proteïna alternativa d'alta qualitat, comparable a altres fonts convencionals, rica en compostos bioactius, i la seva producció es considera respectuosa amb el medi ambient. No obstant això, la seva bioactivitat sobre la salut humana ha estat poc analitzada i calen més estudis.

El tracte gastrointestinal (GIT) és la interfície més gran del cos exposada al medi extern. Té un paper crucial en la detecció, processament i absorció dels components dels aliments, així com en la defensa immunitària de l'hoste. La disrupció de la barrera intestinal pot permetre que les endotoxines entrin al torrent sanguini i desencadenin inflamació sistèmica i trastorns metabòlics. Per tant, mantenir la salut intestinal és essencial per al benestar general. En aquest sentit, no cal dir que els components dietètics tenen un impacte significatiu en la salut intestinal i en la funció barrera. Per exemple, les dietes riques en greixos saturats i sucres han estat implicades en la disbiosi intestinal i la inflamació, mentre que els aliments rics en fibra i altres compostos bioactius naturals són coneguts per promoure una funció intestinal saludable.

Pel que fa al reconeixement d'aliments, els receptors del gust s'han identificat com a dianes potencials que, alhora, són modulades pels components dels aliments. Tradicionalment associats a la cavitat oral, actualment se sap que aquests receptors s'expressen en diversos llocs extraorals, com el GIT, on sembla que regulen algunes funcions importants. No obstant això, encara hi ha una manca d'evidència sobre la modulació dels receptors del gust per part de proteïnes de la dieta, i l'impacte que això pot tenir en l'intestí i la salut general.

Per tot això, plantegem la hipòtesi que el consum d'insectes, a través de la seva interacció amb el tracte gastrointestinal i, específicament, a través dels receptors in-

testinals del gust, podria modular potencialment la funció de barrera intestinal i, per tant, exercir efectes sobre el benestar general, en estat de salut i malaltia.

Per demostrar la nostra hipòtesi, vam establir els objectius específics següents:

Objectiu 1. Investigar els efectes del consum crònic d'insectes a dosis baixes sobre la funció intestinal i la salut en general, tant en condicions saludables com inflammatòries

Els insectes són rics en proteïnes i proporcionen una gran varietat d'altres nutrients, incloent-hi àcids grassos monosaturats i poliinsaturats, vitamines i minerals. Malgrat que hi ha algunes evidències que suggereixen potencials beneficis del consum d'insectes, la investigació dels efectes del consum d'insectes sobre la salut intestinal, particularment en relació amb la inflamació i la permeabilitat, continua sent limitada. Per tant, per abordar aquest buit en la recerca, en primer lloc ens vam proposar determinar els efectes aguts *ex vivo* dels insectes sobre la resposta immunitària intestinal en mostres de còlon humà, en comparació amb fonts de proteïnes més convencionals com la carn de boví i l'ametlla. A més, els efectes del seu consum crònic *in vivo* en situació intestinal alterada no han estat àmpliament estudiats. En aquest sentit, el nostre objectiu era estudiar els efectes del consum d'insectes sobre la salut intestinal i general, en termes de metabolisme, inflamació, al·lergenicitat i morfologia tissular, en rates sanes i amb disfunció intestinal induïda per LPS.

Objectiu 2. Estudiar la modulació de l'expressió gènica dels receptors del gust intestinal pel consum d'insectes i les seves implicacions en diferents condicions de salut

Els receptors del gust extraorals, com els receptors intestinals del gust, s'han postulat com a dianes clau per desencadenar respostes metabòliques i inflammatòries. S'ha suggerit que la seva expressió està modulada per components dietètics, per l'estat de salut o per l'edat, entre d'altres, però no s'ha investigat l'efecte de la suplementació d'insectes sobre l'expressió dels receptors del gust. En aquest sentit, el nostre objectiu va ser determinar l'efecte de la suplementació crònica d'insectes a dosis baixes sobre l'expressió dels receptors intestinals del gust i conèixer-ne les implicacions per a la salut, tant en l'àmbit intestinal com sistèmic, en rates sanes i amb disfunció intestinal induïda per LPS.

Objectiu 3. Analitzar l'efecte del consum crònic d'insectes, com a font única de proteïnes, sobre la salut intestinal i el benestar general, tant en rates sanes com en situació d'obesitat induïda per la dieta

A causa del seu contingut en aminoàcids i pèptids bioactius, s'ha postulat que el consum d'insectes pot induir diferents respostes intestinals, inflamatòries i metabòliques en comparació amb el consum d'una font proteica convencional. Encara que alguns estudis han demostrat efectes aguts del consum d'insectes o de la substitució parcial de les fonts proteiques convencionals, hi ha una manca d'evidència dels efectes sobre la salut del consum crònic de dietes basades en insectes com a única font proteica. Per això, el nostre objectiu va ser avaluar els amplis efectes de les dietes basades en insectes en diversos aspectes de la salut i la fisiologia, i comparar-los amb els induïts per fonts proteiques convencionals, tant en models saludables com en obesitat induïda per la dieta.

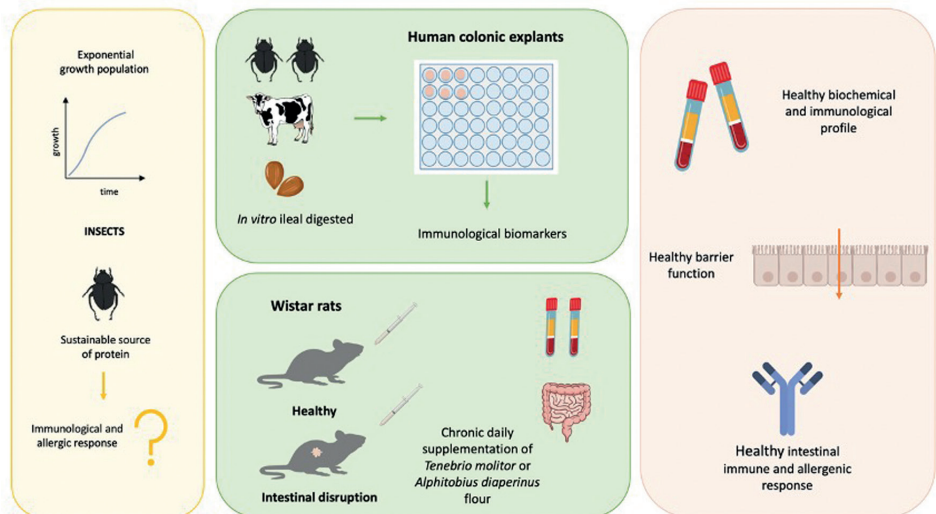
Part 1

Investigació dels efectes del consum crònic de dosis baixes d'insectes sobre la funció intestinal i la salut en general, en condicions tant saludables com inflamatòries

Manuscrit 1

Assessing the impact of insect protein sources on intestinal health and disease: insights from human ex vivo and rat in vivo models

Publicat a Food and Function, 2 d'abril de 2024



Cite this: *Food Funct.*, 2024, **15**, 4552

Assessing the impact of insect protein sources on intestinal health and disease: insights from human *ex vivo* and rat *in vivo* models

Helena Segú,^a Florijan Jalševac,^a Marta Sierra-Cruz,^a Francesc Feliu,^b Jamileh Movassat,^c Esther Rodríguez-Gallego,^a Ximena Terra,^a Montserrat Pinet,^a Anna Ardévol^{a,*} and M. Teresa Blay^a

The exploration of edible insects, specifically *Alphitobius diaperinus* and *Tenebrio molitor*, as sustainable sources of protein for human consumption is an emerging field. However, research into their effects on intestinal health, especially in relation to inflammation and permeability, remains limited. Using *ex vivo* and *in vivo* models of intestinal health and disease, in this study we assess the impact of the above insects on intestinal function by focusing on inflammation, barrier dysfunction and morphological changes. Initially, human intestinal explants were exposed to *in vitro*-digested extracts of these insects, almond and beef. Immune secretome analysis showed that the inflammatory response to insect-treated samples was comparatively lower than it was for samples exposed to almond and beef. Animal studies using yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) and buffalo (*Alphitobius diaperinus*) flours were then used to evaluate their safety in healthy rats and LPS-induced intestinal dysfunction rats. Chronic administration of these insect-derived flours showed no adverse effects on behavior, metabolism, intestinal morphology or immune response (such as inflammation or allergy markers) in healthy Wistar rats. Notably, in rats subjected to proinflammatory LPS-induced intestinal dysfunction, *T. molitor* consumption did not exacerbate symptoms, nor did it increase allergic responses. These findings validate the safety of these edible insects under healthy conditions, demonstrate their innocuity in a model of intestinal dysfunction, and underscore their promise as sustainable and nutritionally valuable dietary protein sources.

Received 22nd January 2024,
Accepted 1st April 2024
DOI: 10.1039/d4fo00381k
rsc.li/food-function

Introduction

There is an urgent need nowadays to feed an exponentially growing human population. As a result, the demand for protein is expected to increase by 70% in the next 30 years.¹ Current food research therefore focuses on incorporating foods derived from novel and sustainable protein sources such as insects.^{2,3} Although insects have long been a common component of the human diet, in Western countries entomophagy is still in its early stages.⁴ However, several reasons support incorporating insects into our diets as a valuable source of protein.

Firstly, insects contain a large amount of protein, accounting for over 50 percent of their crude weight. This abundant protein has high biological quality thanks to the presence

of all essential amino acids.^{5–7} Insects also contain large amounts of unsaturated fatty acids, minerals, and vitamins.⁸ In addition, insects have been identified as a source of bioactive compounds with anti-hypertensive, antidiabetic, antioxidant, and anti-inflammatory activity.⁹

Also in support of insect consumption is the fact that insect production is more environmentally sustainable than the production of conventional livestock.⁸ Indeed, insect-based protein is emerging as a cost-effective alternative to meat protein since its production employs minimal resources, requires less water and less land, and is responsible for a much lower carbon footprint than the production of meat protein.^{4,10} Moreover, since insects can feed on bio-waste (such as mushroom waste and fruit peels), they can mitigate the environmental impact by turning waste into compost.¹¹

For all these reasons, in the not-too-distant future insect protein will probably become a component of the total protein consumed by humans.⁵ To enhance social acceptance, insect protein can also be processed into food ingredients such as flour, which can then be incorporated into food products.¹²

The yellow mealworm *Tenebrio molitor*, and the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: family Tenebrionidae),

^aMaBioFood Research Group, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, C/Marcel·lí Domingo 1, 43007 Tarragona, Spain. E-mail: anna.ardevol@urv.cat

^bServet de Gastroenterologia, Institut Sanitari Pere Virgili, Tarragona, Spain

^cUniversité Paris Cité, CNRS, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, F-75013, Paris, France



are both larvae of the beetles that grow in flour and grain cereals. These edible larvae possess significant nutritional value as they encompass a full spectrum of amino acids that are rich in essential fatty acids and vitamins as well as a higher mineral content (including calcium, copper, magnesium, iron and zinc) than conventional meats and eggs.^{10,13–15} *Tenebrio molitor* commonly breeds in Europe and, together with *Alphitobius diaperinus*, is the main species used for farm-animal feed and considered for human consumption.¹⁰

Recent reports from the European Food Safety Authority (EFSA) positively evaluated both these mealworms as novel foods suitable for human consumption.^{16,17} The safety profiles of *T. molitor* and *A. diaperinus* larvae as novel foods are based on nutritional studies that assessed the microbiological risk of zoonosis, heavy metal contamination and allergy. However, the EFSA recommends that further research should be conducted in this area.^{14,17}

Recent studies have suggested beneficial effects of edible insects in terms of inflammation and intestinal health. For instance, a study with *Tenebrio molitor* larvae powder described its ability to attenuate pathologic changes in colon tissue and down-regulate the expression of inflammatory cytokine genes in mice (DSS)-induced colitis.¹⁸ Moreover, an *in silico* analysis indicated that *Tenebrio molitor* could be a source of peptides with anti-inflammatory activity.¹⁹ Further, *in vitro*-digested proteins from three different insects have been proposed to exhibit antioxidant and anti-inflammatory effects.²⁰ Additionally, in a human intervention study, cricket consumption was found to improve gut health and reduce systemic TNF- α levels;²¹ while other studies also indicated improvements in microbiota and metabolic benefits in animals after the consumption of mealworms.^{22,23} Collectively, this evidence suggests potential health benefits associated with insect consumption, particularly in the context of intestinal tract and inflammatory response.²⁴

However, a current concern about insect consumption is the potential allergic effects on sensitized individuals or those allergic to other inhalant or food allergen sources such as house dust mites or crustaceans.^{24,25} The yellow mealworm and lesser mealworm belong to the Insecta class, one of the four subphyla of Arthropoda. In relation to arthropods, several allergens have been reported, including tropomyosin,²⁶ arginine kinase,²⁷ chitinases²⁸ and glutathione S-transferase,²⁹ that affect humans through cross-reactivity. However, studies in this context suggest that the allergenicity of edible insects is species-specific and that thermal processing may partially reduce cross-allergenicity.³⁰ In the context of insect mealworm protein, individuals allergic to shrimps exhibited cross-reactivity due to high protein homology across different arthropod subphyla,³¹ while one case report that documented food-induced anaphylaxis to *T. molitor* in a patient allergic to dust mites attributed the allergic response to α -amylase, tubulin, and larval cuticle proteins.³²

The origins of allergic diseases have traditionally been explained by immunoglobulin E-mediated immune responses

to account for asthma, atopic dermatitis, atopic rhinitis, and food allergy. Research insights into disease origins support a broader array of factors that predispose, initiate, or exacerbate altered immunity in allergic diseases, such as (1) inherent epithelial barrier dysfunction; (2) loss of immune tolerance; (3) disturbances in the gut; and (4) organ-specific microbiomes, diet, and age.³³ Here, we focus on the gut barrier function as a key factor in preventing or facilitating food allergy. In fact, Galli *et al.* previously reported that epithelial barrier deficiencies often lead to a state of constant inflammation that makes tissue repair difficult. Deficient barrier integrity facilitates allergen entry and lowers the threshold for sensitization to innocuous substances because of the inflammatory environment, and therefore likely precipitates allergic sensitization at distal organs.³⁴

Although the consumption of *Alphitobius diaperinus* and *Tenebrio molitor* has raised concerns about their potential to induce food allergic reactions in sensitized or allergic individuals, research into the specific health impacts of these insects, including both their detrimental and beneficial effects, is still limited and further studies are needed to understand their role in inflammation and intestinal dysfunction.

Thus, this paper analyses how insect flours interacted with the gastrointestinal tract in the human intestine *ex vivo* and how this interaction might influence the response of the whole organism in rats, focussing on the immunologic response. From a more holistic view of allergy development, we evaluated how the effects of low-dose insect supplementation depend on disease status by comparing the effects on a healthy animal vs. a model of LPS-induced inflammation and intestinal barrier dysfunction.

Experimental methods

Ex vivo study with human colonic explants exposed to *in vitro* digested insect, beef and almond

Buffalo (*A. diaperinus*) powder and insect protein concentrate powder (IPC) from *A. diaperinus* (Protifarm, Belgium), a lean portion of beef (*Bos primogenitors*) from the Central Market in Tarragona, Spain, and almond (*Prunus dulcis*) flour from Borges Agricultural & Industrial Nuts (BAIN) were used for human colon treatments. Samples were stored in the dark at -20°C until use.

Buffalo, IPC, beef and almond food powders were then *in vitro* digested according to the INFOGEST harmonized protocol.³⁵ This digestion involved simulating *in vivo* digestion in oral, gastric and intestinal stages *in vitro* using commercial enzymes such as amylase, pancreatin and trypsin and inactivating the enzymes. The detailed procedures and characterization of the digestion products have been described previously.³⁶

To check the effectiveness of enzymatic digestion, SDS-PAGE was performed with the samples obtained.³⁷

For the explant culture, healthy viable colon tissues were obtained from 10 patients (average age 65 years) who had undergone colon surgery. All donor patients met the study criteria and gave their informed consent. The exclusion criteria



were anti-inflammatory drug use, alcohol abuse, and intestinal disease. The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee (CEIC) of the Hospital Universitari Joan XXIII in Tarragona (CEIm 101/2017).

Tissues obtained from the proximal and distal colon were transferred to the culture laboratory within 30 min in cold oxygenated Krebs–Ringer buffer (pH = 7.4) with D-mannitol 10 mM.³⁸

The excised samples were cut up to generate six explants from each human donor. The 5 mm diameter explants were placed in a 48-well plate pre-filled with 400 µL of KRB buffer with D-mannitol, and divided into five treatment groups: control, beef, almond, insect, and IPC. The control group was treated with the same KRB buffer with glucose. The digested samples were adjusted to a dose of 5 mg protein per mL. The medium was collected after 30 minutes of incubation and stored at –80 °C.

The secretion of human inflammatory cytokines and intestinal immunoglobulins TNF-α, IL-10, IL-8, IgE and sIgA was quantified using Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) with colorimetric detection. The overall experimental procedure is shown in Fig. 1. For immunosecretome analysis in human colon explants, intestinal secretion of IL-10, IL-1β, IgE and sIgA was measured with the Elabscience ELISA kit (Texas, United States). The human TNF-α ultrasensitive ELISA kit was obtained from ThermoFisher (Invitrogen, Barcelona) (Cat. no: KHC3014). Colon IL-8 secretion was measured with Millipore (Sigma Aldrich, Madrid) (Cat. no: RAB0319). All immunomarkers were measured according to manufacturers' instructions.

In vivo study of the consumption of *A. diaperinus* and *T. molitor* flour by Wistar rats

Buffalo (*A. diaperinus*) flour was obtained from Protifarm NV (Ermelo, Gelderland, The Netherlands) with a caloric content of 6.1 kcal g⁻¹ and a macronutrient composition of 56.31% protein, 18.82% fat, 7.44% fibre, and 6.3% carbohydrates (1.30% starch).

T. molitor flour from larvae was prepared from insects purchased from a local supplier (Iberinsect, S.L; Reus, Spain). Insect flour was prepared and processed by the FoodIE Research Group and the Mobiofood Research Group at

Universitat Rovira i Virgili (URV), Spain. The composition of *T. molitor* flour was 56.10% protein, 26.31% lipids and 7.78% carbohydrates (3.34% starch), as measured by AGROLAB, S.A. The caloric content was determined to be 6.23 kcal g⁻¹ by the Institute of Agrifood Research and Technology (IRTA, Catalonia, Spain).

The microbial content of *A. diaperinus* flour was determined at Protifarm (Ermelo, Gelderland, The Netherlands). The microorganism content of *T. molitor* flour was analysed at AGROLAB S.A (Tarragona, Spain). Both microbiological analyses showed levels of bacteria, moulds and yeasts absent or below the toxicity levels for both insects.

Forty, six-week-old, Wistar female rats (Janvier, Castellar del Vallès, Spain) were included in the *in vivo* study. The animals spent an adaptation period of 14 days at the Universitat Rovira Virgili animal facility under standard conditions. They were caged in pairs at 22 °C with a standard 12-hour light–dark cycle, ventilation, *ad libitum* access to tap water, and a standard Teklad diet (Cat no: Teklad 2014, Envigo+, Barcelona, Spain) consisting of 20% protein, 13% fat and 63% carbohydrates. The rats' standard diet was a plant-based protein maintenance diet with 4.073 kcal g⁻¹, as measured by IRTA, Catalonia, Spain.

After this adaptation period, the animals were individualized and randomly divided into five experimental groups, with identical initial body weight, each of which was given a different treatment. Lipopolysaccharide (LPS) treatment was given, based on the body weight (BW) of the rats, to induce intestinal immune disruption. LPS was obtained from *E. coli* serotype O111:B5 (Merck Lifesciences, Madrid, Spain; Cat no: 4357765). As detailed in Miguéns-Gómez *et al.*,³⁹ the treatment lasted 26 days (also shown in Fig. 2) and involved five groups as follows:

Group 1 comprised animals that received a standard (STD) diet *ad libitum* (C group);

Group 2 comprised animals that received an STD diet plus five intraperitoneal (i.p.) doses of LPS at 0.5 mg kg⁻¹ of BW on the last five days (C + LPS group);

Experimental design of explants study

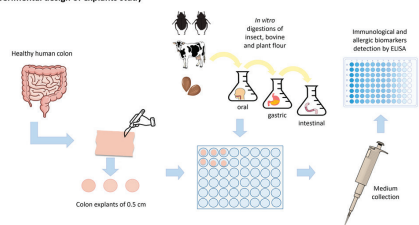


Fig. 1 Graphical representation of the experimental design of the explants' study.

Experimental design of animal study

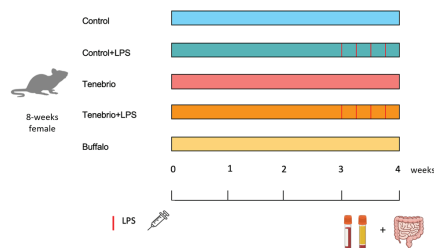


Fig. 2 Experimental design of Wistar rat study.



Group 3 comprised animals that received an STD diet plus a daily oral dose of *T. molitor* flour (300 mg of protein per kg BW per day) (T group);

Group 4 comprised animals that received STD diet plus a daily oral dose of *T. molitor* flour (300 mg of protein per kg BW per day) and an i.p. dose of LPS 0.5 mg per kg of BW on the last five days (T + LPS group); and

Group 5 comprised animals that received STD diet plus a daily oral dose with *A. diaperinus* flour (300 mg of protein per kg BW per day) (Buffalo group).

The insect flours were administered by controlled voluntary oral intake with a syringe, at a dose of 300 mg of protein per kilogram of body weight dissolved in water, at 6 pm. The treatment thus consisted only of raw insect meal mixed with tap water, while the control groups received the equivalent volume of tap water.

During the experiment, the health status of the animals was regularly monitored for cleanliness, general physical appearance, faecal consistency, and stress symptoms (hair loss, lack of appetite, etc.).

After 21 days, the animals were euthanized *via* exsanguination under anaesthesia, administered at a dose of 100 mg per kg BW of pentobarbital. Some of the rats' main organs (the duodenum, jejunum and ileum from the small intestine; the distal and proximal large intestine; and the thymus, spleen, kidney and liver) were excised, weighed and frozen immediately in liquid nitrogen for future analysis. White abdominal adipose tissue (WAT) from mesenteric, retroperitoneal and epididymal locations was excised and weighed to calculate the percentage of adiposity. Blood was collected with ethylenediaminetetraacetic acid (Deltalab, Barcelona, Spain) as anticoagulant. Plasma was obtained by centrifugation at 1500g for 15 min at 4 °C and frozen immediately at –80 °C for future parameter quantification. All procedures were approved by the GENCAT Animal Experimentation Committee (number 11701).

Biochemical analysis

Colorimetric kits from QCA, (Tarragona, Spain), Materlab (Madrid, Spain) and Wako (Kyoto, Japan) were used to determine the following plasma biochemical parameters: cholesterol (QCA, Ref. 995282), glucose (QCA, Ref. 998282), triacylglycerols (QCA, Ref. 992330), urea (QCA, Ref. 993648), creatinine (QCA, Ref. 990310) and ketone bodies (β -hydroxybutyrate), (Materlab, Ref. HB8855).

Intestinal barrier, immunological and allergenic analyses

Two days before euthanasia, the ovalbumin (OVA) test was run to determine intestinal permeability.⁴⁰ These analyses were carried out using Ovalbumin ELISA kits (Cat. no. MBS2000240) from MyBioSource (San Diego, CA, USA).

Plasma levels of total IgE and histamine were measured as biomarkers of allergy at the end of the experimental period. IgE (Cat. no. CN: E-EL-R0517) and histamine (Cat. no. CN: E-EL-0032) kits were purchased from Elabscience (Texas, United States) and performed according to the manufacturer's instructions.

Plasma inflammatory cytokine markers (IL-1 β , IL-10, and TNF- α) were determined by ELISA. The ELISA kit for IL-10 (Cat.

no. CN: 88-50629) was purchased from ThermoFisher (Invitrogen) (Life Technologies, Madrid, Spain). ELISA for TNF- α (Cat. no. E-EL-R2856) and IL-1 β (Cat. no. E-ELL-R0012) were purchased from Elabscience.

After the intestine was removed and before the intestinal parts were excised, the intestinal lumen contents were subjected to two lavages with 4 mL of PBS. The intestinal lumen contents of the small and large intestine were obtained separately and frozen immediately at –80 °C for future analysis. Secretory IgA (sIgA) levels were measured in small and large intestinal lavage fluids using the ELISA kit from MyBioSource (Cat. no. MBS9711882).

Total RNA and cDNA were obtained as previously reported.⁴¹ Quantitative PCR amplification was performed using specific TaqMan® probes for the sIgA inducing protein (Rn01406210_s1) and IL-1 β (Rn00580432_m1) genes, and PPIA (cyclophilin) (Rn00690933_m1) as reference gene. The relative expression of each gene was compared with the control group using the 2- $\Delta\Delta$ Ct method and with the cyclophilin gene as reference.

Histological analysis of the intestinal sections

One centimetre of each part of the intestine was fixed for 24 h in 4% formaldehyde solution and transferred to 70% ethanol solution for preservation until it was embedded in paraffin blocks. The samples analysed (at the Laboratory of Biology and Pathology of the Endocrine Pancreas of the Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, CNRS at Université Paris Cité, F-75013 Paris, France) were the duodenum, jejunum, ileum and ascending colon from five animals from each experimental group.

Samples were cut at 5 mm and placed on glass slides. Haematoxylin and eosin (H&E) staining was then performed following standard procedures.

Using an OLYMPUS BX60 microscope equipped with Histolab 10.5.1 (Microvision Instruments, Evry, France) software for histology and morphometrics counting, the intestinal epithelium was analysed by measuring the villus height, villus width, crypt depth, epithelium height and villus-to-crypt ratio, as described in our previous study.⁴² The percentage of goblet cells was also analysed by counting the number of goblet cells and the number of epithelial cells.

Statistical analysis

Results are presented as means $\pm$ SEM. Data analysis was conducted with the XLSTAT 2023 statistical software (Addinsoft, USA). In the *ex vivo* human experiment, group differences were assessed through one-way ANOVA, followed by Tukey HSD multiple comparisons test.

For the rat experiment, statistical differences were analysed using Student's *t* test, comparing each experimental group with the corresponding control group. Specifically, Tenebrio, Buffalo and Control + LPS were compared with Control, while Tenebrio + LPS was compared to Control + LPS.

Statistical significance was considered for mean differences if *p* < 0.05.



Results

Insect-derived flours produced a healthier inflammatory secretome in human colonic explants

To assess how the human colonic immune system responds to various protein sources, we exposed healthy human colon explants to digested flours for 30 minutes at a concentration protein that stimulated enterohormone secretions in paired colonic samples.³⁷

The levels of proinflammatory protein IL-8 and TNF- α were determined in the media of colonic explants after insect, almond and beef exposure (Fig. 3). IL-8 levels from human explants treated with insect and IPC showed lower inflammatory profiles than those treated with beef or almond (Fig. 3A). Beef also had a proinflammatory effect by inducing an increase in TNF- α levels, whereas neither insect, IPC nor almond treatment led to elevated TNF- α levels (Fig. 3B).

Also assessed was the anti-inflammatory cytokine IL-10, which was significantly higher in explants treated with almond flour but remained unchanged after insect, IPC or beef treatment (Fig. 3C).

The levels of sIgA showed the extent of protection from intestinal pathogens in the intestinal lumen. No treatment showed changes in sIgA levels with respect to the control (Fig. 3D).

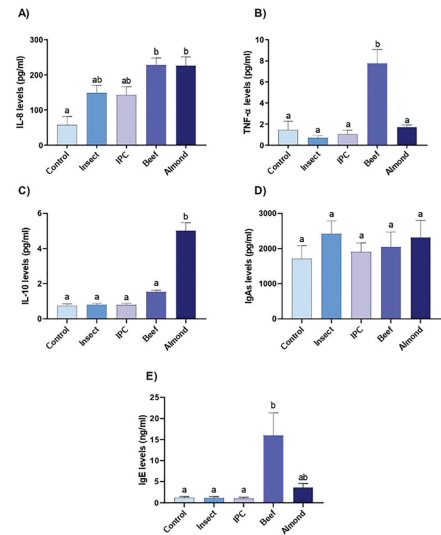


Fig. 3 Effect of different digested proteins (5 mg protein per mL) on levels of IL-8 (A), TNF- α (B), IL-10 (C), sIgA (D) and IgE (E) in human colon explants. Results are represented as mean $\pm$ SEM. n = 10 humans per group. We used ANOVA and Tukey multiple comparisons test. P values < 0.01. Different letters indicate significant differences.

Also determined was the level of allergy-related IgE immunoglobulin (Fig. 3E). Neither whole insect nor IPC from *A. diaperinus* showed a similar allergenic profile to that of almond extract, whereas beef induced a significant increase in IgE levels.

Whole-health status of insect-fed rats

To analyse the effects on an *in vivo* system, we worked with two animal models, one of which was a healthy rat and the other was a model of LPS-induced mild inflammation and intestinal dysfunction.⁴³ This LPS-induced disease model wants to mimic all pathologies that presented an altered physical barrier and a proinflammatory intestinal environment in the small intestine which would be the best candidates to be sensitive to this atypical food component.^{44,45} Using these animal models, we tested two species of insects to detect potential species-specific effects.

In the healthy rat model, after 21 days of insect administration no animal showed any physical sign of stress (gastro-intestinal, respiratory, or skin alteration) during the nutritional intervention. Treatment with buffalo flour did not change the weight of any organs in comparison with those of the control. Supplementation with *T. molitor* insect flour produced a trend towards an increase in % body weight gain but not in adiposity and did not change the weight of the thymus, liver, stomach, spleen, or kidney. There were no differences in total intestinal length between the groups (Table 1). In healthy rats, the ingestion of insect flour did not modify glucose, triglycerides (TAGs) or total cholesterol (Table 2). The levels of ketone bodies were undetectable and urea and creatinine in plasma were unchanged by insect consumption.

In line with the results in humans, in this healthy model the administration of insect protein (Buffalo or Tenebrio flour) did not alter the levels of the proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α . Similarly, no changes were observed in IL-10.

In the intestinal dysfunction model, the weights of the liver and spleen in the LPS group clearly increased while that of the thymus decreased (Table 1). *Tenebrio molitor* ingestion in LPS-

Table 1 Organ weights of healthy Wistar female rats and LPS-Wistar inflamed rats after daily ingestion of *T. molitor* or *A. diaperinus* for 21 days

Organ (g)	Control	Tenebrio	Buffalo	LPS	LPS + Tenebrio
Liver	7.46 $\pm$ 0.35	7.86 $\pm$ 0.19	8.06 $\pm$ 0.25	8.91 $\pm$ 0.37*	9.41 $\pm$ 0.28
Stomach	1.38 $\pm$ 0.07	1.42 $\pm$ 0.04	1.41 $\pm$ 0.03	1.33 $\pm$ 0.03	1.37 $\pm$ 0.05
Kidney	0.34 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.01
Thymus	0.49 $\pm$ 0.04	0.57 $\pm$ 0.05	0.52 $\pm$ 0.10	0.33 $\pm$ 0.03*	0.49 $\pm$ 0.06*
Small Intestine length (cm)	97.6 $\pm$ 0.57	100.1 $\pm$ 0.17	98.0 $\pm$ 0.44	96.2 $\pm$ 0.68	100.6 $\pm$ 0.52
Spleen	0.84 $\pm$ 0.05	0.84 $\pm$ 0.03	0.86 $\pm$ 0.04	1.53 $\pm$ 0.10*	1.49 $\pm$ 0.13
% BW gain	9.42 $\pm$ 1.03	13.98 $\pm$ 2.83 [#]	9.80 $\pm$ 1.04	7.01 $\pm$ 1.40	6.64 $\pm$ 1.26
% Adiposity	4.38 $\pm$ 0.25	5.12 $\pm$ 0.59	4.26 $\pm$ 0.26	4.12 $\pm$ 0.21	4.37 $\pm$ 0.49

n = 7–8 animals per group. Data are mean $\pm$ SEM. Student's *t* test was performed. * indicates p < 0.05 vs. control group; [#] indicates p < 0.1 vs. control group; $\S$ p < 0.05 vs. LPS.

Table 2 Biochemical markers of metabolic status in healthy and LPS-inflamed female Wistar rats with a daily insect intake of *Tenebrio molitor* or *Alphitobius diaperinus* for 21 days

Plasma	Control	Tenebrio	Buffalo	LPS	LPS + Tenebrio
Glucose (mM)	7.18 ± 0.15	7.21 ± 0.38	7.35 ± 0.14	6.44 ± 0.24*	7.09 ± 0.16 [#]
TAGs (mM)	0.18 ± 0.02	0.22 ± 0.05	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.20 ± 0.01
Cholesterol (mM)	0.45 ± 0.01	0.46 ± 0.03	0.48 ± 0.03	0.35 ± 0.02*	0.37 ± 0.02
Urea (mM)	3.20 ± 0.21	2.93 ± 0.13	3.28 ± 0.13	1.70 ± 0.18*	2.11 ± 0.13 [#]
Creatinine (μM)	2.68 ± 0.49	2.59 ± 0.28	3.18 ± 0.24	2.64 ± 0.56	3.43 ± 0.34

Plasma levels of glucose, triglycerides, cholesterol, urea and creatinine at the end of the study. $n = 7-8$ animals per group. Data are mean ± SEM. Student's t test was performed. * indicates $p < 0.05$ vs. control group; [#] $0.05 > p < 0.1$ vs. LPS.

treated animals slightly prevented the decrease in thymus weight compared to the LPS group. The disease model presented mild alterations in some biochemical parameters (Table 2). LPS treatment reduced the plasma levels of total cholesterol, glucose and the urea. However, TAGs and creatinine remained unchanged. Interestingly, ingestion of *T. molitor* seemed to prevent the decrease in blood glycemia and uraemia.

Effects of insect consumption on intestinal permeability, immune barrier and allergenicity

Both LPS-treated groups showed an increase in intestinal permeability compared to controls, though insect supplementation did not exert any significant effect with this time and dose (Fig. 4a). In healthy rats, insect supplementation showed no change in intestinal permeability compared to controls (Fig. 4a).

To evaluate the effect of insect protein consumption in a pro-inflammatory environment, we measured the serum levels of TNF- α , IL-1 β and IL-10. Fig. 4c shows that treatment with LPS significantly increased the levels of TNF- α and increased IL-10 and IL-1 β almost three-fold (Fig. 4b and d) in comparison with the control group. Treatment with *T. molitor*, on the other hand, did not modify the secretion of these cytokines.

To assess the health and functionality of the mucosal immune system, we quantified the secretion of secretory immunoglobulin A (sIgA) at the intestinal level. In the healthy model, the results showed that more sIgA was secreted in the small intestine than in the colon (Table 3). Ingestion of the Buffalo and Tenebrio flours alone had no effect on sIgA levels in either the small intestine or the colon.

In the disease model, when comparing the LPS group with the Control group, the statistical analysis indicates a tendency to increase. However, animals that received both LPS injection and consumed Tenebrio did not show significant differences or a trend, neither with the Tenebrio group nor the LPS group. Intraperitoneal LPS administration had local immunology effects in the small intestine but not in the colon. We also analyzed relative expression in the ileum of sIgA activation protein (Table 3) but observed no significant changes in gene expression in either the healthy or the LPS-induced inflammatory group.

To evaluate potential *in vivo* sensitization to the consumption of *A. diaperinus* or *T. molitor* insect flour for 21 days, IgE and histamine plasma biomarkers were tested. In the healthy

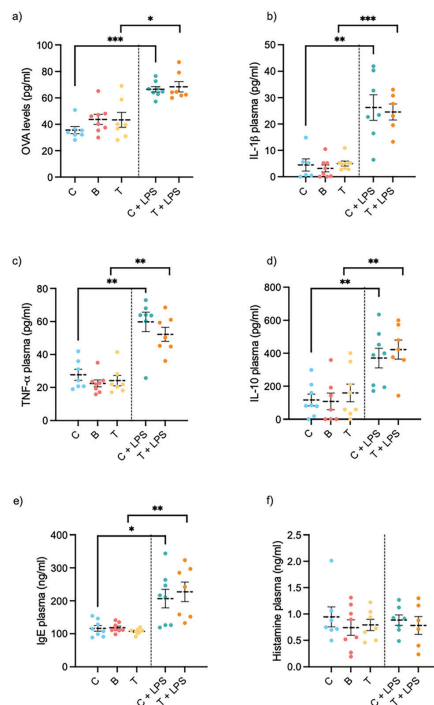


Fig. 4 Changes in intestinal permeability ((a) OVA test), plasma systemic inflammation ((b) IL-1 β , (c) TNF- α and (d) IL-10), allergenic response ((e) IgE and (f) histamine) after chronic doses of insect protein flour in healthy and in LPS-induced inflammation female rats. Animals ($n = 7-8$ per treatment) were treated for 21 days. Experimental groups are (C) standard diet; (C + LPS) Control diet plus i.p. LPS (0.5 mg per kg BW) for the last five days; (T) 300 mg protein per kg BW daily supplement of *Tenebrio molitor* flour; (T + LPS); 300 mg protein per kg BW daily supplement of *Tenebrio molitor* flour diet plus i.p. LPS (0.5 mg per kg BW) for the last five days; (B) 300 mg protein per kg BW daily supplement of *Alphitobius diaperinus* flour. *, ** or *** correlation's p -value < 0.05 , 0.01 or 0.001 , respectively, denotes statistical significance by Student's t test.

Table 3 Secretory immunoglobulin A (sIgA) at the intestinal level

	Control	Tenebrio	Buffalo	LPS	LPS + Tenebrio
Small intestine sIgA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	9.94 ± 1.25	8.00 ± 0.63	8.65 ± 1.37	17.2 ± 3.49 [#]	13.6 ± 1.95
Ileal IgA i.p. gene expression	0.91 ± 0.14	1.19 ± 0.30	0.87 ± 0.07	1.04 ± 0.19	0.76 ± 0.20
Colonic sIgA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	1.27 ± 0.09	1.19 ± 0.08	1.17 ± 0.05	1.13 ± 0.05	1.23 ± 0.08

$n = 7-8$ animals per group. Data are mean ± SEM. Student's t test was performed. [#] indicates $0.05 > p < 0.1$ vs. control.



Paper

Table 4 Morphometric intestinal variables affected by insect consumption in healthy and LPS-Wistar rats

Small intestine	Control	Tenebrio	Buffalo	LPS	LPS + Tenebrio
Duodenum (µm)					
Villus length	548.13 ± 31.24	616.33 ± 29.62	597.29 ± 23.19	558.27 ± 25.37	549.71 ± 34.04
Villus width	78.48 ± 3.27	79.57 ± 2.43	76.21 ± 3.03	83.32 ± 2.88	79.80 ± 2.43
Crypt depth	168.94 ± 8.63	196.92 ± 17.41	187.20 ± 10.81	191.89 ± 17.18	181.79 ± 9.71
Crypt width	71.25 ± 4.42	71.05 ± 2.77	74.86 ± 4.77	78.86 ± 5.83	73.85 ± 2.31
Epithelium w	777.34 ± 22.76	848.24 ± 54.28	854.31 ± 48.23	803.30 ± 40.45	791.76 ± 45.40
Villus/crypt ratio	3.34 ± 0.45	3.50 ± 0.67	3.20 ± 0.08	3.01 ± 0.32	3.06 ± 0.24
M (surface ratio)	8.4 ± 0.12	9.4 ± 0.52	8.79 ± 0.46	7.93 ± 0.60	8.17 ± 0.52
Jejunum (µm)					
Villus length	404.72 ± 14.96	407.33 ± 14.02	414.78 ± 12.81	393.50 ± 26.82	366.32 ± 17.30
Villus width	55.28 ± 2.74	55.86 ± 5.69	53.77 ± 5.20	58.14 ± 2.68	52.73 ± 5.39
Crypt depth	168.94 ± 8.63	196.92 ± 17.41	187.20 ± 10.81	191.89 ± 17.18	181.79 ± 9.71
Crypt width	58.34 ± 4.42	58.44 ± 5.54	51.92 ± 3.79	56.76 ± 3.00	54.76 ± 2.49
Epithelium w.	586.74 ± 24.38	576.25 ± 20.85	588.07 ± 18.35	576.25 ± 20.85	533.05 ± 22.47
Villus/crypt ratio	2.90 ± 0.03	3.37 ± 0.12*	3.22 ± 0.15&	3.28 ± 0.33	3.00 ± 0.05
M (surface ratio)	7.8 ± 0.43	7.96 ± 0.67	8.8 ± 0.51	7.7 ± 0.57	7.45 ± 0.39
Ileum (µm)					
Villus length	269.50 ± 21.89	282.90 ± 5.14	248.96 ± 16.71	244.04 ± 10.28	261.89 ± 11.79
Villus width	55.92 ± 6.38	46.60 ± 2.03	47.93 ± 7.06	53.98 ± 5.08	47.16 ± 1.33
Crypt depth	102.55 ± 7.06	100.05 ± 5.51	103.73 ± 3.39	105.62 ± 3.13	104.95 ± 3.64
Crypt width	58.14 ± 1.98	54.08 ± 2.60	55.74 ± 1.43	53.10 ± 2.79	51.49 ± 1.67
Epithelium w	408.46 ± 24.50	429.35 ± 12.06	381.82 ± 20.50	374.73 ± 16.02	397.30 ± 15.42
Villus/crypt ratio	2.61 ± 0.15	2.85 ± 0.13	2.41 ± 0.20	2.21 ± 0.01*	2.49 ± 0.05 [§]
M (surface ratio)	5.41 ± 0.52	6.02 ± 0.29	5.20 ± 0.20	5.28 ± 0.05	5.87 ± 1.21
Large intestine					
Colon (µm)					
Crypt depth	113.76 ± 15.40	103.56 ± 8.61	106.84 ± 7.06	106.13 ± 6.58	95.22 ± 6.27
Crypt width	40.95 ± 1.35	40.75 ± 1.50	38.55 ± 2.27	39.46 ± 1.53	39.47 ± 1.69

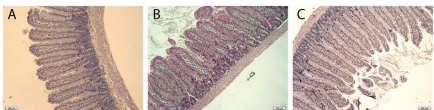
n = 7–8 animals per group. Data are mean ± SEM. Student's *t* test was performed. * indicates *p* < 0.05 vs. control group; [§] *p* < 0.05 vs. LPS; & 0.05 > *p* < 0.1 vs. control.

model, neither the histamine nor the IgE levels showed any significant change between groups when the animals received insect flour (see Fig. 4f). In the disease model, IgE plasmatic levels increased significantly compared to controls, while histamine levels remained unchanged after insect consumption.

Intestinal morphometry in healthy and LPS-Wistar rat models under insect supplementation

To evaluate any putative micro-gut morphological alterations caused by the consumption of insect flour from mealworm and buffalo, we histochemically analysed the morphometric size of the villus and crypt and determined the total epithelium and surface amplification ratio of all intestinal sections (duodenum, jejunum, ileum and proximal colon) (see Table 4) as well as their Goblet cell percentage. Scheme 1 shows examples of the images used for the analysis.

In healthy animals, our results showed that insect flour consumption did not modify villus width, villus height, crypt depth, villus-to-crypt ratio, epithelium width or the M-surface amplification ratio from any intestinal location. This is an indicator of the absence of a deleterious effect. Only Tenebrio increased the villus-to-crypt ration in the jejunum. No changes in Goblet cell number were observed in any intestinal section.



Scheme 1 Examples of images obtained of jejunal sections of (A) Control group, (B) Tenebrio group and (C) LPS group. Magnification 10x.

The same parameters were also measured in the inflammatory rat model with and without insect flour supplementation (Table 4). In the inflammatory model, a slight proinflammatory state influenced some parameters, including the ileum villus-to-crypt ratio, which decreased, thus indicating a morphological deleterious effect. Interestingly, *T. molitor* supplementation prevented this effect. No changes in Goblet cell number were observed.

Discussion

We have investigated the effect of a sustainable source of protein on human explants and Wistar rats, focusing on intestinal immunological effects. In a previous complementary work³⁹ we analysed their effects in food intake and enteroh-

mone modulation. Specifically, two edible insect species approved for human consumption by EFSA were analysed: *Alphitobius diaperinus* and *Tenebrio molitor*.⁴⁷ Here our results showed healthy responses with regard to systemic and intestinal inflammation, allergenic response, and intestinal morphology in rats after chronic insect supplementation in both healthy and intestinal disfunction models. This is the first description of the non-allergenic effect of insect ingestion in a disrupted permeability and intestinal inflammation animal model.

The gastrointestinal tract – the primary barrier against food components – plays a crucial role in host defence and immune response.⁴⁶ Some studies have reported that increased permeability of the intestinal epithelium can facilitate the entry of potential food allergens, thus heightening sensitization and allergy risks.^{33,47} Notably, the intraperitoneal injection of lipopolysaccharides (LPS) leads to systematic and local alterations, including increased intestinal permeability and exacerbated inflammation.^{43,48}

In the context of insect consumption, the potential allergic response is a significant concern. While most existing research focuses on pre-sensitized individuals or those with allergies to crustaceans and inhalants,⁴⁹ our study aimed to advance this field by assessing allergenic responses in the context of disrupted intestinal permeability and inflammation. Our results from the LPS model rats revealed an impaired inflammatory and allergic response, as has previously been described.⁴³ However, in the group that received insect supplementation, no aggravation of this situation was observed, which suggests that the insect did not exert any allergenic response in this rat model of intestinal dysfunction.

Moreover, by evaluating the response to insect consumption in both healthy and non-sensitized human and rat models, our study offers a comprehensive overview of the allergenic potential of low-dose insect consumption. In this sense, the healthy rats that were chronically supplemented by yellow mealworm or lesser mealworm had a normal profile of secreted inflammatory and anti-inflammatory cytokines, while histamine and total IgE were not altered. Previous studies conducted with Sprague-Dawley rats, with longer oral exposures to insects and maximum doses ($300\text{--}3000\text{ mg kg}^{-1}\text{ day}^{-1}$) of mealworm, also found no statistically significant increases in serum histamine or IgE concentrations.⁵⁰ Our data with doses of $300\text{ mg kg}^{-1}\text{ day}^{-1}$ for 21 days in Wistar females corroborate those results.

We also directly compared the human colonic immune response to insect extracts to the response to almond and beef protein sources. Our results indicated that exposure to insect extracts led to a lower secretion of inflammatory cytokines and allergenic immunoglobulin compared to almond or beef extracts. Beef especially appeared to be more proinflammatory, as was evidenced by higher cytokines and IgE levels. On the other hand, the response to almond appeared to be counterbalanced by an anti-inflammatory effect. These findings align with previous *in vivo* studies that suggest that beef consumption can alter gut microbiota and activate inflammatory

pathways,^{51,52} while almond consumption is known to exert a protective effect against the development of gastrointestinal inflammation.⁵³ Moreover, while explants treated with beef exhibited higher IgE secretion, these levels are still within the low and normal range for intestinal tissue,⁵⁴ which suggests that this is not indicative of an allergic response. All these results support the notion of a healthier inflammatory secretome for insect-derived flours compared to those from almond and beef.

An important effector function of gut-associated lymphoid tissue involves the production and secretion of immunoglobulin A (IgA). This immunoglobulin plays a crucial role in protecting the intestine from pathogens, mainly by limiting their interactions with the epithelial cell monolayer.⁵⁵ The transcytosis of dimeric IgA antibodies through epithelial cells is mediated by the polymeric Ig receptor, which results in the release of secretory IgA (sIgA).⁵⁶ In this context, local antigen exposure could lead to increased sIgA levels in both the exposed area and the enteric mucosa. Measuring IgA in intestinal lavage fluids is therefore a common method for assessing mucosal immune responses.⁵⁵ Our animal study showed a tendency only for increased sIgA secretion in rats administered with LPS. In contrast, neither human explants nor rats treated solely with protein sources showed significant alterations in this intestinal immune marker. This suggests that the consumption of these protein sources, including insects, does not cause major immune disturbances, thereby aligning with findings reported by Stull *et al.*²¹

To continue with the intestinal analysis, our findings also showed that insect supplementation did not affect normal intestinal morphology. The typical gradient of morphometric indices from the duodenum to the ileum was maintained, which corroborates the preservation of physiological gut development and absorption processes.⁵⁷ Similar to these results obtained by Biasato *et al.* in chickens, chronic insect consumption did not alter the intestinal morphology. Main modification was in the jejunum, where animals supplemented with insects exhibited a higher villus-height to crypt-depth ratio. This effect has been suggested as adaptive response to expand the surface area for nutrient absorption.⁵⁸ Our study does not allow support this hypothesis, because there was not a clear effect on food intake, we saw an increased food intake at the first week, but it was lost afterwards.³⁹ And the other challenging aspect regarding insects-derived products is their digestibility. In this respect, we have previously shown a similar digestibility of *A. diaperinus* to beef samples.⁵⁹ Moreover, a lower ileal villus-to-crypt ratio was observed in rats administered LPS, which confirms the finding from studies on mice that the intraperitoneal injection of LPS affects the integrity of the small intestine.⁶⁰ Interestingly, the consumption of *T. molitor* appeared to counteract this reduction in the ileal ratio.

Moreover, our findings reveal a reduction in thymus weight following LPS injections, consistent with other studies that have previously reported the potential for LPS-induced thymic atrophy.^{61,62} The thymus is a vital organ of the immune system, and its atrophy could compromise its ability to effec-



tively respond to other infections.⁶³ Interestingly, our observations suggest that the consumption of *T. molitor* may confer protection to the thymus against changes induced by LPS. Despite not observing other improvements in terms of inflammatory status, this result aligns with the potential anti-inflammatory effects associated with insect consumption, as indicated by existing literature.²⁴ Furthermore, some authors have proposed that thymus gland dysfunction can be ameliorated through nutritional intervention, involving a balance of macronutrients, micronutrients, and the incorporation of probiotics, indicating thymus-gut connections.^{64,65} Thus, the potential of insect supplementation to modulate gut microbiota with prebiotic effects,⁶⁶ may be linked to thymus healthy. Further research exploring both the inflammatory protection and the prebiotic effects of insect consumption could contribute to a comprehensive understanding of its impact on inflammation.

Although this study primarily focused on the immune system's response, we also considered whole-health parameters. With regard to the plasma parameters, our study indicates good metabolic tolerance to insect administration, with *T. molitor* intake notably ameliorating LPS-altered glucose and urea levels. Our study does not allow to explain these effects, but we can clearly state that they cannot relate it with improvement of TNF- α or IL-1 β , which have been demonstrated to induce hypoglycaemia.⁴⁵ We cannot discard results from other studies that have reported improved circulating triglycerides, glucose and cholesterol levels in humans and animals following insect consumption.¹ Our initial screening of plasmatic cytokine levels, known to participate in systemic inflammation and exhibiting increased levels in the LPS situation,⁶⁷ revealed that LPS administration alone increased the immunological parameters, but the ingestion of insect flour did not exacerbate this effect. Notably, the LPS-induced increase in IL-10 plasma levels is a typical counter-regulatory response to intraperitoneal insult mediated by T-regulatory cells to resolve inflammation.⁶⁸

Note that the EFSA recently approved the insects used in this study as novel food for human consumption and encouraged further research in this area.^{16,17} There is growing consensus on the need for further studies to demonstrate the health benefits of insect consumption and enhance its social acceptance, especially in Western diets, which urgently need to change from a conventional to a more sustainable source of protein.⁶⁹ The present study describes, for the first time, the chronic effects of consuming two species of insects on both general and intestinal health in rat and human samples and provides novel insights into the immune response in a healthy and a disrupted intestinal model.

In view of all the evidence in support of adding insects to diets and the encouraging results of this study, to validate these findings further research should involve human participants without known allergies. Long-term studies are needed to fully understand the impact of edible insects on human health. As the food industry explores alternative sources of protein, edible insects present a unique opportunity to improve environmental sustainability while also providing substantial nutritional advantages.

Conclusions

The human *ex vivo* studies have shown that *A. diaperinus* digested *in vitro* induced a less inflammatory profile than either almond or beef extract in colon samples. Moreover, neither *A. diaperinus* nor *T. molitor* administered chronically in moderate doses to healthy Wistar rats compromised gut morphology, plasma biochemistry profile or immune response. In the LPS-induced intestinal dysfunction model, insect consumption ameliorated glycaemia, uraemia and gut villus-to-crypt ratio. These data reinforce the healthy immunological profile of both species of insect assayed. More insights are needed on the bioactive effects of insect flour, especially with regard to the less studied *Alphitobius diaperinus*.

Author contributions

HS, FJ and MSC: data curation, formal analysis, investigation; FF: investigation; ERG, JM and XT: methodology; AA, MTB, XT and MP: conceptualization, supervision. AA, MTB, HS: project administration, original draft; MP, XT, JM and AA: resources. All the authors participated in funding acquisition and revised and edited the final document before submission.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

We would like to thank Niurka Llopiz and Rosa M. Pastor for respective technical support.

This research was funded by Diputació de Tarragona and Universitat Rovira i Virgili (URV) grant number DIPTA-007 2020/26 (ESSARPI), MCIN/AEI PID2021-122636OB-I00 by ERDF "A way of making Europe", TED2021-131783B-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by the "European Union NextGenerationEU/PRTR". M. Sierra and H. Segú were funded by the M. Franquès programme of the URV. F. Jalševac was funded by Marie Skłodowska Curie grant agreement no. 945413 and Universitat Rovira i Virgili (URV). Montserrat Pinet and Ximena Terra are Serra Hünter fellows.

References

- 1 M. Ros-Baró, P. Casas-Agustench, D. A. Díaz-Rizzolo, L. Batlle-Bayer, F. Adrià-Acosta, A. Aguilar-Martínez, F. X. Medina, M. Pujolà and A. Bach-Faig, Edible Insect Consumption for Human and Planetary Health: A Systematic Review, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2022, **19**, 11653.
- 2 IPIFF, The European insect sector today: Challenges, opportunities and regulatory landscape. IPIFF vision paper



- on the future of the insect sector towards 2030, https://ipiff.org/wp-content/uploads/2019/12/2019IPIFF_VisionPaper_updated.pdf, (accessed 20 April 2022).
- 3 IPIFF, An overview of the European market of insects as feed, https://ipiff.org/wp-content/uploads/2021/04/Apr-27-2021-IPIFF_The-European-market-of-insects-as-feed.pdf, (accessed 15 August 2023).
 - 4 N. M. de Carvalho, A. R. Madureira and M. E. Pintado, The potential of insects as food sources—a review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2020, **60**, 3642–3652.
 - 5 A. Jantzen da Silva Lucas, L. Menegon de Oliveira, M. da Rocha and C. Prentice, Edible insects: An alternative of nutritional, functional and bioactive compounds, *Food Chem.*, 2020, **311**, 126022.
 - 6 B. A. Rumpold and O. K. Schlüter, Nutritional composition and safety aspects of edible insects, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2013, **57**, 802–823.
 - 7 D. A. T. Sosa and V. Fogliano, Potential of Insect-Derived Ingredients for Food Applications, *Insect Physiol. Ecol.*, 2017, DOI: [10.5772/67318](https://doi.org/10.5772/67318).
 - 8 C. L. R. Payne, P. Scarborough, M. Rayner and K. Nonaka, Are edible insects more or less 'healthy' than commonly consumed meats? A comparison using two nutrient profiling models developed to combat over- and undernutrition, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2016, **70**, 285.
 - 9 Z. Ma, M. Mondor, F. Goycoolea Valencia and A. J. Hernández-Alvarez, Current state of insect proteins: extraction technologies, bioactive peptides and allergenicity of edible insect proteins, *Food Funct.*, 2023, **14**, 8129–8156.
 - 10 L. Selaleti, C. A. Mbajioru and M. Mabelebele, The use of yellow mealworm (*T. molitor*) as alternative source of protein in poultry diets: a review, *Trop. Anim. Health Prod.*, 2020, **52**, 7–16.
 - 11 A. Nikkha, S. Van Haute, V. Jovanovic, H. Jung, J. Dewulf, T. Cirkovic Velickovic and S. Ghnimi, Life cycle assessment of edible insects (*Protaetia brevitarsis* seculensis larvae) as a future protein and fat source, *Sci. Rep.*, 2021, **11**, 14030.
 - 12 S. Mancini, G. Sogari, S. E. Diaz, D. Menozzi, G. Paci and R. Moruzzo, Exploring the Future of Edible Insects in Europe, *Foods*, 2022, **11**, 455.
 - 13 L. Soetemans, N. Gianotten and L. Bastiaens, Agri-Food Side-Stream Inclusion in The Diet of *Alphitobius diaperinus*. Part 2: Impact on Larvae Composition, *Insects*, 2020, DOI: [10.3390/INSECTS11030190](https://doi.org/10.3390/INSECTS11030190).
 - 14 C. Garino, H. Mielke, S. Knüppel, T. Selhorst, H. Broll and A. Braeuning, Quantitative allergenicity risk assessment of food products containing yellow mealworm (*Tenebrio molitor*), *Food Chem. Toxicol.*, 2020, **142**, 111460.
 - 15 E. Siemianowska, A. Kosewska, M. Aljiewicz, K. A. Skibniewska, L. Polak-Juszczak, A. Jarocki and M. Jedras, Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food, *Agric. Sci.*, 2013, **04**, 287–291.
 - 16 D. Turck, T. Bohn, J. Castenmiller, S. De Henauw, K. Ildico Hirsch-Ernst, A. Maciuk, I. Mangelsdorf, H. J. McArdle, A. Naska, C. Pelaez, K. Pentieva, A. Siani, F. Thies, S. Tsaouri, M. Vinceti, F. Cubadda, T. Frenzel, M. Heinonen, R. Marchelli, M. Neuh, M. Poulsen, M. Prieto Maradona, J. Rudolf Schlatter, H. van Loveren, E. Verweris and H. K. Knutsen, Safety of frozen and freeze-dried formulations of the lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus* larva) as a Novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283 EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA), *EFSA J.*, 2022, **20**, 7325.
 - 17 D. Turck, J. Castenmiller, S. De Henauw, K. I. Hirsch-Ernst, J. Kearney, A. Maciuk, I. Mangelsdorf, H. J. McArdle, A. Naska, C. Pelaez, K. Pentieva, A. Siani, F. Thies, S. Tsaouri, M. Vinceti, F. Cubadda, T. Frenzel, M. Heinonen, R. Marchelli, M. Neuhäuser-Berthold, M. Poulsen, M. Prieto Maradona, J. R. Schlatter, H. van Loveren, E. Verweris and H. K. Knutsen, Safety of dried yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283, *EFSA J.*, 2021, DOI: [10.2903/J.EFSA.2021.6343](https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2021.6343).
 - 18 B. M. Park, B. G. Jung, J. A. Lee and B. J. Lee, Mitigating Effects of *Tenebrio molitor* Larvae Powder Administration in Mice with Dextran Sodium Sulfate (DSS)-Induced Colitis, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2023, **24**, 1751.
 - 19 J. Rivera-Jiménez, C. Berraquero-García, R. Pérez-Gálvez, P. J. García-Moreno, F. J. Espejo-Carpio, A. Guadix and E. M. Guadix, Peptides and protein hydrolysates exhibiting anti-inflammatory activity: sources, structural features and modulation mechanisms, *Food Funct.*, 2022, **13**, 12510–12540.
 - 20 E. Zielińska, B. Baraniak and M. Karaś, Identification of antioxidant and anti-inflammatory peptides obtained by simulated gastrointestinal digestion of three edible insects species (*Gryllobius sigillatus*, *Tenebrio molitor*, *Schistocerca gregaria*), *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2018, **53**, 2542–2551.
 - 21 V. J. Stull, E. Finer, R. S. Bergmans, H. P. Febvre, C. Longhurst, D. K. Manter, J. A. Patz and T. L. Weir, Impact of Edible Cricket Consumption on Gut Microbiota in Healthy Adults, a Double-blind, Randomized Crossover Trial, *Sci. Rep.*, 2018, DOI: [10.1038/S41598-018-29032-2](https://doi.org/10.1038/S41598-018-29032-2).
 - 22 Y. Kang, P. M. Oba, C. A. Gaulke, L. Sánchez-Sánchez and K. S. Swanson, Dietary Inclusion of Yellow Mealworms (*T. molitor*) and Lesser Mealworms (*A. diaperinus*) Modifies Intestinal Microbiota Populations of Diet-Induced Obesity Mice, *J. Nutr.*, 2023, **153**, 3220–3236.
 - 23 E. Colombino, I. Biasato, I. Ferrocino, S. B. Oddon, C. Caimi, M. Gariglio, S. Dabbou, M. Caramori, E. Battisti, S. Zanet, E. Ferroglio, L. Cocolin, L. Gasco, A. Schiavone and M. T. Capucchio, Effect of insect live larvae as environmental enrichment on poultry gut health: Gut mucin composition, microbiota and local immune response evaluation, *Animals*, 2021, **11**, 2819.
 - 24 N. Cunha, V. Andrade, P. Ruivo and P. Pinto, Effects of Insect Consumption on Human Health: A Systematic Review of Human Studies, *Nutrients*, 2023, DOI: [10.3390/NU15143076/S1](https://doi.org/10.3390/NU15143076/S1).
 - 25 K. C. M. Verhoeckx, S. van Broekhoven, C. F. den Hartog-Jager, M. Gaspari, G. A. H. de Jong, H. J. Wichers, E. van Hoffen, G. F. Houben and A. C. Knulst, House dust mite



- (Der p 10) and crustacean allergic patients may react to food containing Yellow mealworm proteins, *Food Chem. Toxicol.*, 2014, **65**, 364–373.
- 26 G. Reese, R. Ayuso and S. B. Lehrer, Tropomyosin: An Invertebrate Pan-Allergen, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1999, **119**, 247–258.
 - 27 M. Binder, V. Mahler, B. Hayek, W. R. Sperr, M. Schöller, S. Prozell, G. Wiedermann, P. Valent, R. Valenta and M. Duchêne, Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen, *J. Immunol.*, 2001, **167**, 5470–5477.
 - 28 X. Zhao, L. Li, Z. Kuang, G. Luo and B. Li, Proteomic and immunological identification of two new allergens from silkworm (*Bombyx mori* L.) pupae, *Cent. Eur. J. Immunol.*, 2015, **40**, 30–34.
 - 29 P. A. Galindo, M. Lombardero, J. Borja, E. Gómez, F. Feo, D. Barber and R. García, A new arthropod panallergen?, *Allergy*, 2001, **56**, 195–197.
 - 30 C. Lamberti, S. Nebbia, S. Cirrincione, L. Brussino, V. Giorgis, A. Romito, C. Marchese, M. Manfredi, E. Marengo, M. G. Giuffrida, G. Rolla and L. Cavallarini, Thermal processing of insect allergens and IgE cross-recognition in Italian patients allergic to shrimp, house dust mite and mealworm, *Food Res. Int.*, 2021, **148**, 110567.
 - 31 H. C. H. P. Broekman, A. C. Knulst, G. de Jong, M. Gaspari, C. F. den Hartog Jager, G. F. Houben and K. C. M. Verhoeckx, Is mealworm or shrimp allergy indicative for food allergy to insects?, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2017, DOI: [10.1002/MNFR.201601061](https://doi.org/10.1002/MNFR.201601061).
 - 32 P. Beaumont, J. Courtois, X. Van der Brempt and S. Tollenaere, Food-induced anaphylaxis to *Tenebrio molitor* and allergens implicated, *Rev. Fr. Allergol.*, 2019, **59**, 389–393.
 - 33 J. W. Krempski, C. Dant and K. C. Nadeau, The origins of allergy from a systems approach, *Ann. Allergy, Asthma, Immunol.*, 2020, **125**, 507–516.
 - 34 S. J. Galli, M. Tsai and A. M. Piliponsky, The development of allergic inflammation, *Nature*, 2008, **454**, 445–454.
 - 35 L. Egger, O. Ménard, C. Delgado-Andrade, P. Alvito, R. Assunção, S. Balance, R. Barberá, A. Brodtkorb, T. Cattenoz, A. Clemente, I. Comi, D. Dupont, G. Garcia-Llatas, M. J. Lagarda, S. Le Feunteun, L. JanssenDuijghuijsen, S. Karakaya, U. Lesmes, A. R. Mackie, C. Martins, A. Meynier, B. Miralles, B. S. Murray, A. Pihlanto, G. Picariello, C. N. Santos, S. Simsek, I. Recio, N. Rigby, L. E. Rioux, H. Stoffers, A. Tavares, L. Tavares, S. Turgeon, E. K. Ulleberg, G. E. Vegarud, G. Vergères and R. Portmann, The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action, *Food Res. Int.*, 2016, **88**, 217–225.
 - 36 A. Miguéns-Gómez, C. Grau-Bové, M. Sierra-Cruz, R. Jorba-Martin, A. Caro, E. Rodríguez-Gallego, R. Beltrán-Debón, M. T. Blay, X. Terra, A. Ardévol and M. Pinent, Gastrointestinally digested protein from the insect *alphitobius diaperinus* stimulates a different intestinal secretome than beef or almond, producing a differential response in food intake in rats, *Nutrients*, 2020, **12**, 1–15.
 - 37 A. Miguéns-Gómez, C. Grau-Bové, M. Sierra-Cruz, R. Jorba-Martin, A. Caro, E. Rodríguez-Gallego, R. Beltrán-Debón, T. Blay, X. Terra, A. Ardévol and M. Pinent, Gastrointestinally Digested Protein from the Insect *Alphitobius diaperinus* Stimulates a Different Intestinal Secretome than Beef or Almond, Producing a Differential Response in Food Intake in Rats, *Nutrients*, 2020, **12**, 2366.
 - 38 C. Grau-bové, C. González-quilen, X. Terra, M. Teresa Blay, R. Beltrán-Debón, R. Jorba-martin, B. Espina, M. Pinent and A. Ardévol, Effects of Flavanols on Enteroendocrine Secretion, *Biomolecules*, 2020, **10**, 1–14.
 - 39 A. Miguéns-Gómez, M. Sierra-Cruz, H. Segú, R. Beltrán-Debón, E. Rodríguez-Gallego, X. Terra, M. T. Blay, A. M. Pérez-Vendrell, M. Pinent and A. Ardévol, Administration of *Alphitobius diaperinus* or *Tenebrio molitor* before meals transiently increases food intake through enterohormone regulation in female rats, *J. Sci. Food Agric.*, 2023, **103**, 1660–1667.
 - 40 K. Gil-Cardoso, I. Ginés, M. Pinent, A. Ardévol, M. Blay and X. Terra, The co-administration of proanthocyanidins and an obesogenic diet prevents the increase in intestinal permeability and metabolic endotoxemia derived to the diet, *J. Nutr. Biochem.*, 2018, **62**, 35–42.
 - 41 C. González-Quilen, K. Gil-Cardoso, I. Ginés, R. Beltrán-Debón, M. Pinent, A. Ardévol, X. Terra and M. T. Blay, Grape-Seed Proanthocyanidins are Able to Reverse Intestinal Dysfunction and Metabolic Endotoxemia Induced by a Cafeteria Diet in Wistar Rats, *Nutrients*, 2019, DOI: [10.3390/nu11050979](https://doi.org/10.3390/nu11050979).
 - 42 H. Segú, F. Jalševac, M. Pinent, A. Ardévol, X. Terra and M. T. Blay, Intestinal Morphometric Changes Induced by a Western-Style Diet in Wistar Rats and GSPE Counter-Regulatory Effect, *Nutrients*, 2022, DOI: [10.3390/nu14132608](https://doi.org/10.3390/nu14132608).
 - 43 K. Gil-Cardoso, R. Comitato, I. Ginés, A. Ardévol, M. Pinent, F. Virgili, X. Terra and M. Blay, Protective Effect of Proanthocyanidins in a Rat Model of Mild Intestinal Inflammation and Impaired Intestinal Permeability Induced by LPS, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2019, DOI: [10.1002/MNFR.201800720](https://doi.org/10.1002/MNFR.201800720).
 - 44 M. J. Rodriguez, A. Aranda, T. D. Fernandez, N. Cubells-Baeza, M. J. Torres, F. Gomez, F. Palomares, J. R. Perkins, J. Rojo, A. Diaz-Perales and C. Mayorga, LPS promotes Th2 dependent sensitisation leading to anaphylaxis in a Pru p 3 mouse model, *Sci. Rep.*, 2017, DOI: [10.1038/SREP40449](https://doi.org/10.1038/SREP40449).
 - 45 S. Seemann, F. Zohles and A. Lupp, Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation, *J. Biomed. Sci.*, 2017, DOI: [10.1186/s12929-017-0370-8](https://doi.org/10.1186/s12929-017-0370-8).
 - 46 T. Takiishi, C. I. M. Fenero and N. O. S. Câmara, Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life, *Tissue Barriers*, 2017, DOI: [10.1080/21688370.2017.1373208](https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1373208).



- 47 R. P. Schleimer, A. Kato, R. Kern, D. Kuperman and P. C. Avila, Epithelium: At the interface of innate and adaptive immune responses, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007, **120**, 1279.
- 48 K. Ramírez, D. Quesada-Yamasaki and J. Fornaguera-Trias, A protocol to perform systemic lipopolysaccharide (LPS) challenge in rats, *Odovtos – Int. J. Dent. Sci.*, 2019, **21**, 53–66.
- 49 L. De Marchi, A. Wangorsch and G. Zoccatelli, Allergens from Edible Insects: Cross-reactivity and Effects of Processing, *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2021, DOI: [10.1007/s11882-021-01012-Z](https://doi.org/10.1007/s11882-021-01012-Z).
- 50 S. R. Han, B. S. Lee, K. J. Jung, H. J. Yu, E. Y. Yun, J. S. Hwang and K. S. Moon, Safety assessment of freeze-dried powdered *Tenebrio molitor* larvae (yellow mealworm) as novel food source: Evaluation of 90-day toxicity in Sprague-Dawley rats, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2016, **77**, 206–212.
- 51 D. P. Li, M. Cui, F. Tan, X. Y. Liu and P. Yao, High Red Meat Intake Exacerbates Dextran Sulfate-Induced Colitis by Altering Gut Microbiota in Mice, *Front. Nutr.*, 2021, **8**, 646819.
- 52 Y. Yin, J. Cai, L. Zhou, L. Xing and W. Zhang, Dietary oxidized beef protein alters gut microbiota and induces colonic inflammatory damage in C57BL/6 mice, *Front. Nutr.*, 2022, **9**, 980204.
- 53 G. Mandalari, T. Gervasi, D. W. Rosenberg, K. G. Lapsley and D. J. Baer, Effect of Nuts on Gastrointestinal Health, *Nutrients*, 2023, **15**, 1733.
- 54 W. R. Brown, B. K. Borthistle and S.-T. Chen, Immunoglobulin E (IgE) and IgE-containing cells in human gastrointestinal fluids and tissues, *Clin. Exp. Immunol.*, 1975, **20**, 227–237.
- 55 S. S. Ghosh, J. Wang, P. J. Yannie and S. Ghosh, Intestinal Barrier Dysfunction, LPS Translocation, and Disease Development, *J. Endocr. Soc.*, 2020, DOI: [10.1210/JENDSO/BVZ039](https://doi.org/10.1210/JENDSO/BVZ039).
- 56 J. L. Gommerman, O. L. Rojas and J. H. Fritz, Re-thinking the functions of IgA+ plasma cells, *Gut Microbes*, 2014, **5**, 652.
- 57 I. Biasato, I. Ferrocino, E. Biasibetti, E. Grego, S. Dabbou, A. Sereno, F. Gai, L. Gasco, A. Schiavone, L. Cocolin and M. T. Capucchio, Modulation of intestinal microbiota, morphology and mucin composition by dietary insect meal inclusion in free-range chickens, *BMC Vet. Res.*, 2018, DOI: [10.1186/s12917-018-1690-Y](https://doi.org/10.1186/s12917-018-1690-Y).
- 58 S. R. Taylor, S. Ramsamooj, R. J. Liang, A. Katti, R. Pozovskiy, N. Vasan, S. K. Hwang, N. Nahiyaan, N. J. Francoeur, E. M. Schatoff, J. L. Johnson, M. A. Shah, A. J. Dannenberg, R. P. Sebra, L. E. Dow, L. C. Cantley, K. Y. Rhee and M. D. Goncalves, Dietary fructose improves intestinal cell survival and nutrient absorption, *Nature*, 2021, **597**, 263–267.
- 59 F. Accardo, A. Miguéns-Gómez, V. Lolli, A. Faccini, A. Ardévol, X. Terra, A. Caligiani, M. Pinent and S. Sforza, Molecular composition of lipid and protein fraction of almond, beef and lesser mealworm after in vitro simulated gastrointestinal digestion and correlation with the hormone-stimulating properties of the digesta, *Food Res. Int.*, 2022, DOI: [10.1016/j.foodres.2022.111499](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111499).
- 60 E. Im, F. M. Riegler, C. Pothoulakis and S. H. Rhee, Elevated lipopolysaccharide in the colon evokes intestinal inflammation, aggravated in immune modulator-impaired mice, *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.*, 2012, **303**, 490–497.
- 61 Y. Ogikubo, M. Norimatsu, Y. Sasaki, A. Yasuda, J. Saegusa and Y. Tamura, Effect of Lipopolysaccharide (LPS) Injection on the Immune Responses of LPS-Sensitive Mice, *J. Vet. Med. Sci.*, 2004, **66**, 1189–1193.
- 62 M. P. Ullewar and S. N. Umathe, A possible role of endogenous central corticotrophin releasing factor in lipopolysaccharide induced thymic involution and cell apoptosis: Effect of peripheral injection of corticotrophin releasing factor, *J. Neuroimmunol.*, 2015, **280**, 58–65.
- 63 M. Luo, L. Xu, Z. Qian and X. Sun, Infection-Associated Thymic Atrophy, *Front. Immunol.*, 2021, **12**, 652538.
- 64 W. Savino, J. Durães, C. Maldonado-Galdeano, G. Perdigon, D. A. Mendes-da-Cruz and P. Cuervo, Thymus, undernutrition, and infection: Approaching cellular and molecular interactions, *Front. Nutr.*, 2022, **9**, 948488.
- 65 F. Balcells, M. J. Martínez Monteros, A. L. Gómez, S. I. Cazorla, G. Perdigón and C. Maldonado-Galdeano, Probiotic Consumption Boosts Thymus in Obesity and Senescence Mouse Models, *Nutrients*, 2022, DOI: [10.3390/NU14030616/S1](https://doi.org/10.3390/NU14030616/S1).
- 66 V. J. Stull, Impacts of insect consumption on human health, *Wageningen Academic Publishers*, 2021, **7**, 695–713, DOI: [10.3920/JIFF2020.0115](https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0115).
- 67 M. Aries, M. Cook and T. Hensley-McBain, Peripheral Low Level Chronic LPS Injection as a Model of Neutrophil Activation in the Periphery and Brain in Mice, *Res. Sq.*, 2023, DOI: [10.21203/RS.3.RS-3443401/V1](https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-3443401/V1).
- 68 Y. P. Rubtsov, J. P. Rasmussen, E. Y. Chi, J. Fontenot, L. Castelli, X. Ye, P. Treuting, L. Siewe, A. Roers, W. R. Henderson, W. Muller and A. Y. Rudensky, Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces, *Immunity*, 2008, **28**, 546–558.
- 69 M. Molfetta, E. G. Morais, L. Barreira, G. L. Bruno, F. Porcelli, E. Dugat-Bony, P. Bonnarne and F. Minervini, Protein Sources Alternative to Meat: State of the Art and Involvement of Fermentation, *Food*, 2022, **11**, 2065.



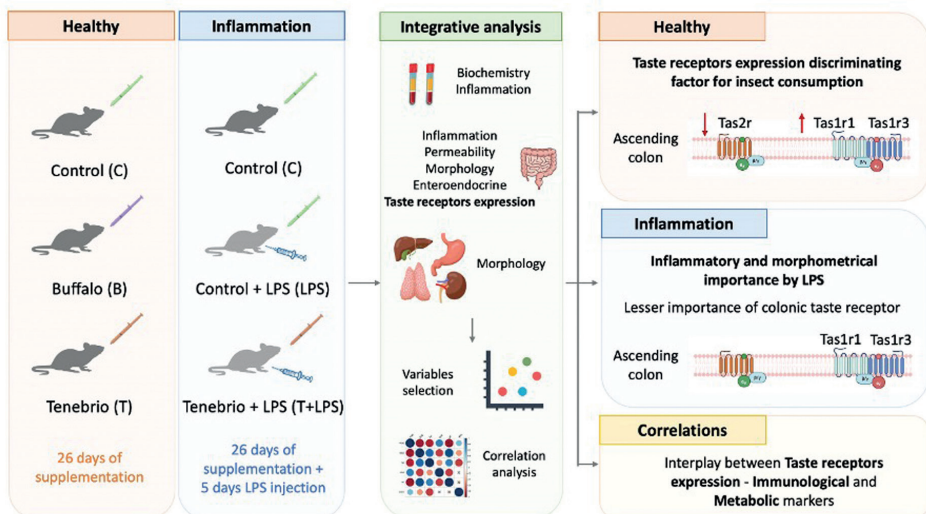
Part 2

Determinació de l'impacte de la suplementació crònica a dosis baixes de proteïna d'insecte sobre l'expressió dels receptors intestinals del gust i les seves implicacions per a la salut en l'àmbit intestinal i sistèmic, en models de salut i disfunció intestinal

Manuscript 2

Intestinal taste receptor expression and its implications for health: an integrative analysis in female rats after chronic insect supplementation

Publicat a Journal of Agricultural and Food Chemistry, 10 de juny de 2024



Intestinal Taste Receptor Expression and Its Implications for Health: An Integrative Analysis in Female Rats after Chronic Insect Supplementation

Helena Segú, Florijan Jalševac, Mònica Lores, Raúl Beltrán-Debón, Ximena Terra, Montserrat Pinent, Anna Ardévol, Esther Rodríguez-Gallego,* and Maria Teresa Blay



Cite This: *J. Agric. Food Chem.* 2024, 72, 13929–13942



Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

ABSTRACT: Taste receptors are found in the gastrointestinal tract, where they are susceptible to dietary modulation, a key point that is crucial for diet-related responses. Insects are sustainable and good-quality protein sources. This study analyzed the impact of insect consumption on the modulation of taste receptor expression across various segments of the rat intestine under healthy or inflammatory conditions. Female Wistar rats were supplemented with *Tenebrio molitor* (T) or *Alphitobius diaperinus* (B), alongside a control group (C), over 21 days under healthy or LPS-induced inflammation. The present study reveals, for the first time, that insect consumption modulates taste receptor gene expression, mainly in the ascending colon. This modulation was not found under inflammation. Integrative analysis revealed colonic Tas1r1 as a key discriminator for insect consumption ($C = 1.04 \pm 0.32$, $T = 1.78 \pm 0.72$, $B = 1.99 \pm 0.82$, p -value <0.05 and 0.01 , respectively). Additionally, correlation analysis showed the interplay between intestinal taste receptors and metabolic and inflammatory responses. These findings underscore how insect consumption modulates taste receptors, influencing intestinal function and broader physiological mechanisms.

KEYWORDS: taste receptors, insect, umami, bitter, intestinal function, integrative analysis, inflammation

INTRODUCTION

Taste receptors are predominantly located in taste buds in various places throughout the oral cavity, where they play a crucial role in recognizing exogenous compounds in food and beverages and other ingested substances. The signals from these receptors are transmitted via afferent gustatory nerves to the brain structures involved in central taste processing.¹ However, these receptors are not limited to the oral cavity as they can also be found in extra-oral tissues and organs throughout the body, from the brain and skin to the reproductive system and gastrointestinal tract.²

Taste receptors are responsible for identifying diverse tastes, including sweet, bitter, salty, sour, and umami. While salty and sour tastes are recognized through ion channels,³ umami, sweet, and bitter receptors belong to the G-protein-coupled receptor (GPCR) superfamily and are divided into two types: TAS1R, which are responsible for sweet and umami tastes, and TAS2R, which identify bitter taste. Among type-1 receptors, Tas1r1, Tas1r2, and Tas1r3 operate as heterodimeric duets. Specifically, the Tas1r2-Tas1r3 heterodimer is responsible for recognizing sweetness while L-amino acids and ribonucleotides interact with Tas1r1-Tas1r3, which constitutes the taste sensation known as umami.^{4,5} With regard to bitter taste receptors, 26 and 37 distinct subtypes have been reported in humans and rats, respectively. However, data regarding the presence of these receptors along the intestine in animal models are still limited. Notably, Tas2r108, Tas2r119, Tas2r138, and Tas2r143 are among the subtypes that exhibit

the highest expression levels of all bitter receptors in rats.⁶ Moreover, each subtype is susceptible to activation by specific bitter compounds or a broad spectrum of them.⁷ However, some of these bitter receptors, including Tas2r108, Tas2r119, Tas2r138, Tas2r139, and Tas2r143, have also been shown to be sensitive to certain peptides and amino acids.^{8–12} This study focuses on the modulation of TAS1R and the TAS2R expression mentioned above along the intestine.

The abundance and tissue distribution of taste receptors, especially in the gastrointestinal tract, raises the prospect of their involvement in physiological functions.¹³ Since the intestine serves as the primary organ for food digestion, a process that occurs over a relatively extended period, chemosensory receptors in the gastrointestinal wall are subjected to prolonged exposure to agonists and antagonists present in ingested food.^{14–17} These components can interact with various receptors, binding and activating them, sending to diverse parts of the organism this information through different kinds of signaling molecules. The localization of taste receptors in the enteroendocrine cells plays a role in regulating the secretion of enteroendocrine peptides, including ghrelin, GLP-

Received: March 18, 2024

Revised: May 27, 2024

Accepted: June 2, 2024

Published: June 10, 2024



1, PYY, and CCK.^{4,18–20} Additionally, several studies have proposed a potential role for taste receptors in the immune function in view of their placement on Goblet and Paneth cells.^{18,21} Some researchers have also demonstrated the ability of dietary components to exert a profound effect on the genetic expression of these receptors in the intestine.^{2,4,16,22} In this context, exploring how a diet or dietary compound interacts with taste receptors becomes crucial for discerning any potential beneficial or detrimental effects.

Protein is essential for human nutrition as it plays an important role in the formation and repair of tissues and the proper functioning of enzymes and hormones.^{23,24} Ensuring sufficient protein intake is crucial for maintaining robust immune function, supporting optimal muscle development, and protecting overall health.²⁵ Abundant evidence strongly supports the postulation that insects are a source of high-quality protein,^{26,27} and are considered sustainable sources of protein that require fewer land and water resources than conventional livestock production.^{27,28} Based on evaluated studies on the microbiological risk of zoonosis, heavy metal contamination, and allergenicity, the European Food Safety Authority (EFSA) has given a favorable opinion on four insects as novel foods, including two mealworms from different beetle species, *Tenebrio molitor* and *Alphitobius diaperinus*, which serve as the focus of study in this article.^{29–32} These two insect species, belong to the Tenebrionidae family of the order Coleoptera, highlighting their taxonomic proximity and the nutritional composition at the larval stage is similar.³³ *T. molitor* has been used across various sectors and in *in vivo* studies and it is considered one of the most promising insect proteins in the food and feed industries.³⁴ However, *A. diaperinus* has been less commonly employed, necessitating further studies on their health effects.³⁵ In this context, some studies have highlighted the bioactive properties of insect peptides, while demonstrating their potential as antihypertensive, anti-inflammatory, antidiabetic, or antioxidant agents.³⁶ Nevertheless, new studies that provide evidence of the health advantages of insect consumption, as well as the precise mechanism of action, are still needed. In this sense, prior findings from our research group indicated that chronic low-dose supplementation of *A. diaperinus* in rats decreased local ghrelin levels in the small intestine and increased food intake.³³ Moreover, our research team has conducted several studies to investigate the impact of *A. diaperinus* and *T. molitor* on intestinal immune function and morphology, under both healthy and inflammatory conditions. Our findings demonstrated healthy responses in terms of systemic and intestinal inflammation, allergenic response, and intestinal morphology in rats after chronic insect supplementation in both conditions.³⁷ However, there is still a lack of evidence for the role of extra-oral taste receptors after insect consumption and its potential implications for intestinal health. Considering the presence of 5-ribonucleotides and several amino acids or peptides specific to insects, these are expected to interact with type I and some type II taste receptors in the intestinal tract, thereby adding a novel dimension to our exploration of the broader impact of insect consumption on intestinal health.³⁸

Given the evidence supporting the potential benefits of insect consumption and the recognized importance of taste receptors in maintaining overall health, our study aimed to explore how dietary components modulate intestinal taste receptors across different health conditions. Specifically, we investigated the broader impact of chronic daily insect

supplementation on taste receptor expression in the rat intestine, encompassing both physiological and inflammatory conditions, with the main aim of elucidating the complex interplay between dietary interventions and organism responses. Through an integrative analysis approach, we explored the modulation of the expression of intestinal taste receptors by insect protein and their potential role in distinguishing between groups receiving insect supplementation and those that do not. Furthermore, in this study, we used an LPS-induced inflammatory model, a well-established experimental approach for studying intestinal dysfunction and systemic alterations, including increased intestinal permeability and exacerbation of inflammation.^{39,40} Through this model, we aimed to gain valuable insights into the mechanisms underlying taste receptor modulation and its relationship to overall health parameters during inflammatory conditions. Additionally, we evaluated the effect of species-specific supplementation, evaluating the most commonly studied mealworm (*T. molitor*) and another less-used larvae (*A. diaperinus*).

■ MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* O111:B4 (impurities ≤3.00% protein) (Merck Lifesciences, Madrid, Spain; Cat No:4357765). Standard Teklad diet (Envigo++, Barcelona, Spain; Cat No: Teklad 2014). *Tenebrio molitor* flour (Iberinsect, S.L.; Reus, Spain), *Alphitobius diaperinus* flour (Protifarm NV, Ermelo, Gelderland, The Netherlands). The nutritional compositions of these two insect flours are described in Table 1. TRIzol reagent (Thermo

Table 1. Nutritional Composition of the Administered Treatments Measured on Dry Matter (Values per 100 g of Insect Flour)

composition	<i>A. diaperinus</i>	<i>T. molitor</i>
energy (kJ)	2550	2604
protein (g)	56.31	56.1
total lipids (g)	18.82	26.31
starch (g)	1.30	3.34
fiber (g)	7.44	7.78

Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Madrid, Spain), Specific TaqMan probes (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain).

Experimental Design. Forty female rats were acclimated for 14 days under standard conditions (22 °C with a 12 h light-dark cycle). During this period, they had *ad libitum* access to water and were fed a standard Teklad diet (Envigo++, Barcelona, Spain; Cat No: Teklad 2014). After this period of adaptation, the rats were divided into five experimental groups (8 rats per group), categorized into healthy and inflammatory conditions (Figure 1). The healthy condition included a control group (Control) fed a standard diet, a group supplemented with *Tenebrio molitor* flour (*Tenebrio*) (300 mg/kg bw/day), and a group supplemented with *Alphitobius diaperinus* flour (*Buffalo*) (300 mg/kg bw/day). On the other hand, the inflammatory condition included a control group receiving 5 days of intraperitoneal lipopolysaccharide (LPS) injections at 0.5 mg/kg of body weight (LPS group), and a group receiving both *Tenebrio molitor* flour and LPS (*Tenebrio* + LPS group). The intervention lasted for 26 days, and additional details of the experimental design have been described in a previous article.³³

After sacrifice, blood was centrifuged to obtain plasma, while tissue samples, including various intestinal segments (duodenum, jejunum, ileum, ascending colon, and descending colon), were rapidly removed, weighed, and frozen in liquid nitrogen before storage at −80 °C until further analysis. After thorough cleaning and removal of fat,

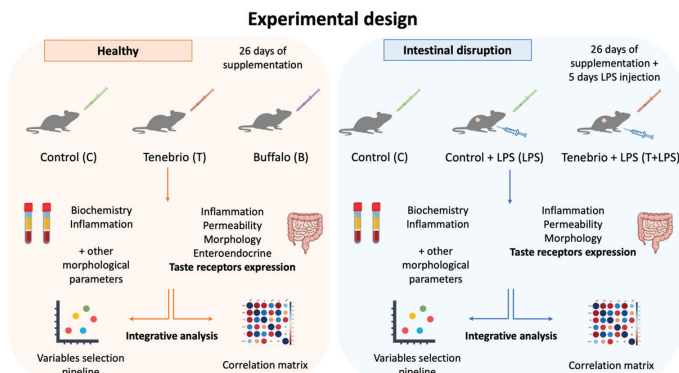


Figure 1. Experimental design.

samples from the duodenum, jejunum, ileum, ascending colon, and descending colon were demarcated according to the intestinal segment division described by Vdoviaková *et al.*⁴¹ All procedures were approved by the GENCAT Animal Experimentation Committee (number 11701).

Gene Expression of Intestinal Taste Receptors. Total RNA was extracted from the entire tubular tissue from each segment of the intestine using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and following the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was obtained using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Madrid, Spain), as described in a previous study.⁴² Quantitative PCR amplification was performed from a total of 40 ng/μL of cDNA using TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Madrid, Spain) and specific TaqMan probes for PPIA (cyclophilin A) (Rn00690933_m1), Tas1r1 (Rn01516038_m1), Tas1r2 (Rn01515494_m1), Tas1r3 (Rn00590759_g1), Tas2r108 (Rn02396427_s1), Tas2r119 (Rn00576950_s1), Tas2r138 (Rn02396417_s1), Tas2r139 (Rn04218919_s1) and Tas2r143 (Rn02585801_s1) genes from Thermo Fisher Scientific. The relative expression of each gene was compared with the control group using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method⁴³ and with the cyclophilin gene as the endogenous control gene.

■ STATISTICAL ANALYSIS

Univariate Analysis. Analyses were performed with XLSTAT 2022 (Addinsoft, USA). A normality test for each group was conducted using the Shapiro-Wilk test. The relative expression of taste receptors is presented in box and whiskers plots, where boxes represent the median and interquartile range and whiskers go down to the smallest value and up to the largest, encompassing the full range of the data. Moreover, the written values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Pairwise comparisons for statistical differences were conducted using the Mann–Whitney test. *p*-values <0.05 were considered statistically significant. These analyses were conducted in two separate conditions: healthy which included Control, Buffalo, and *Tenebrio* groups; and inflammation condition which included Control, LPS, and *Tenebrio* + LPS. Additionally, the Fold Change of each gene expression was calculated as A/B, with A representing the gene expression mean of the *Tenebrio* or Buffalo group and B representing the gene expression mean of the control group when the analysis included the healthy rats. When focused on animal groups

under inflammatory situations, the Fold Change was calculated by taking the gene expression mean of the Control or *Tenebrio* + LPS group as A and the gene expression mean of the LPS group as B.

Integrative Analysis and Variable Selection Pipeline. All data processing, integration, variable selection pipeline, and statistical analysis described in this section were performed using RStudio version 2023.03.1 Build 446 (2009–2023 Posit Software, PBC).

Data encompassing morphometric, biochemical, immunological, and intestinal permeability analysis in this study have previously been collected, analyzed, and used for research purposes.³⁷ These data include tissue weights, intestinal lengths, and biochemical analyses (including glucose, triglycerides, urea, cholesterol, creatinine, and β -hydroxybutyrate). Inflammatory and allergenic parameters in both plasma and intestine (TNF- α , IL-1 β , IL-10, secretory IgA, myeloperoxidase (MPO) activity, IgE, histamine, and the relative gene expression of IgA and IL-1 β) are as well as intestinal permeability. Moreover, results on the secretion of the enterohormones (GLP-1, ghrelin, and insulin), also included in this analysis, have already been published.³³ Additionally, this integral analysis also included the relative gene expression of intestinal taste receptors, which are unique variables to this study and have not been previously used.

All raw data, with medians calculated for missing values and redundant variables removed to reduce data dimensionality and collinearity, were preprocessed. The resulting integrated data consisted of four metabolic variables, six biochemical variables, nine general and twenty-seven intestinal morphometric variables, 12 inflammatory variables, and thirty-one TASR gene expressions. The data were centered and scaled using the "ScaleData" function.

With all the variables, the 'RunPCA' function was employed to conduct principal component analysis (PCA) and determine if samples formed groups or clusters, or if any animal was an outlier that needed exclusion in later steps.

The variables were further analyzed in a multivariate approach by our variable selection pipeline, which takes the consensus of three machine learning methods: Elastic Net, Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), and Random Forest Analysis (RF). Elastic Net is useful for dealing

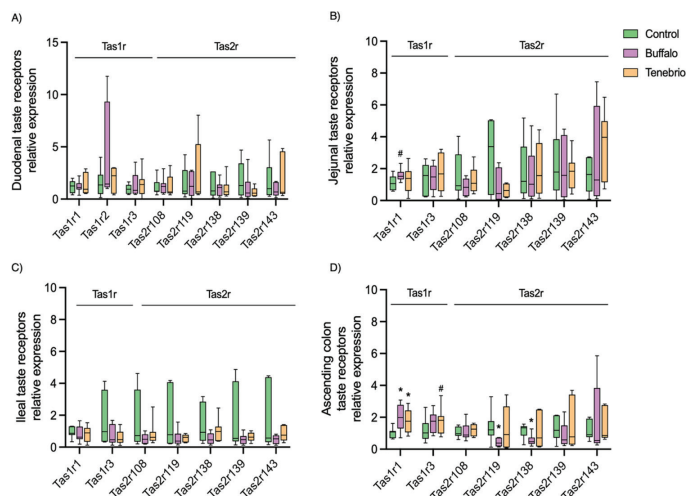


Figure 2. Relative expression of intestinal taste receptors. Animals supplemented with Buffalo for 21 days are represented in purple, those receiving *Tenebrio molitor* in orange, and the control group that received water as a vehicle are depicted in green. The data are presented in a box and whiskers plot. Boxes represent the median and interquartile range, while whiskers extend from the smallest to the largest values, encapsulating the full range of the data. Mann–Whitney analysis were used to compare each insect-supplemented groups with the control group ($n = 7$ – 8 /group). * indicates p -value <0.05 and # indicates $0.05 < p$ -value <0.1 compared to control group.

with data sets containing a large number of features, some of which are highly correlated. PLS-DA is a versatile statistical method for classifying and discriminating in high-dimensional data sets, which makes it well suited for our objective to distinguish between different experimental groups based on the variables analyzed. RF is a powerful, flexible algorithm from the family of tree-based models that can be used for both classification and regression.

Our experimental design encompassed two scenarios: one involving healthy rats and comprising the control, *Tenebrio*, and Buffalo groups, and the other involving rats with induced inflammation and comprising the LPS and *Tenebrio* + LPS groups. We therefore conducted two separate analyses by applying the algorithms to each scenario and comparing (1) the control group with the Buffalo or *Tenebrio* group and (2) the LPS group with the control or *Tenebrio* + LPS group. With this approach, we were able to examine the effects of chronic insect supplementation in both a homeostatic status and an LPS-induced inflammation situation.

Nonzero coefficients from a subset of variables selected from the Elastic Net model, variable importance for projection (VIP) coefficients from the PLS-DA model, and mean decrease Gini values from the RF model were used as measures of variable importance.

Each method generated a set of scores that reflected the importance of variables in relation to the aim of distinguishing between groups. These scores were treated as individual “scores” for each variable within each method. We then calculated a “total score” for each variable by summing its “scores” generated by the three methods. This “total score” serves as an indicator of the overall importance of the variable within the context of the study. The variable with the highest “total score” was considered the most important one in

consensus. In other words, the variable that was selected by most methods and achieved the highest score in each of the four methods was identified as the variable of greatest significance in this study. With these results, an integrative analysis that ranked all variables based on their importance or obtained score was conducted. To refine this ranking and identify the most critical variables for distinguishing among our study groups, we applied the Kneede algorithm. This algorithm identifies the knee (or elbow) point on the curve formed by the sorted importance scores of the variables while demarcating the most influential variables. This selection method enabled us to focus our subsequent analyses on those variables that displayed the greatest discriminative power between the groups, thus ensuring a more targeted and effective investigation.

A Venn Diagram was created to integrate the two analyses in each case: (1) control versus Buffalo with control versus *Tenebrio*; and (2) LPS versus control with LPS versus *Tenebrio* + LPS. This diagram enabled us to determine whether any variable that is crucial in the separation of two groups is also significant in distinguishing one group from a third group. In this context, variables present in the intersection of two ellipses are common to both comparisons. These were then visualized in a Fold Change heatmap that describes how much the variable changes between two conditions, as well as the direction of the change.

Finally, a heatmap based on Spearman correlations of taste receptor expression was conducted to explore potential associations between the relative expressions of taste receptors and the other parameters studied in the experiment.

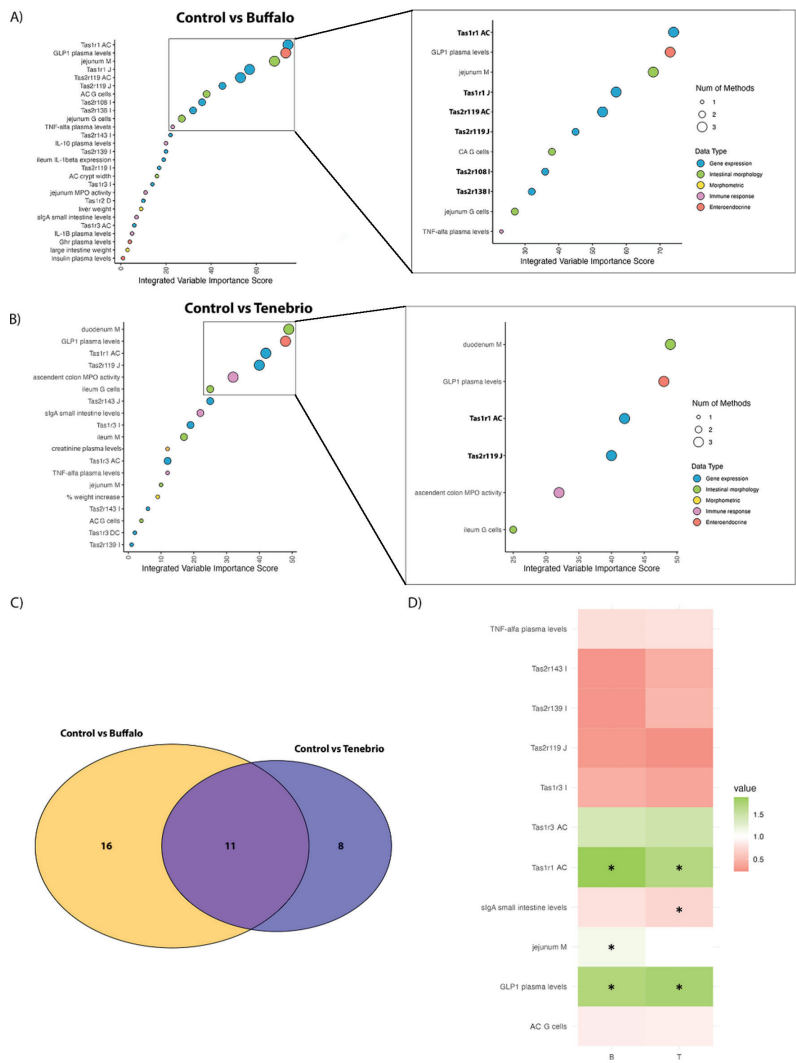


Figure 3. Principal variables distinguishing between the control group and insect-supplemented groups. (A and B) integrate the analysis of selected variables using machine learning algorithms, ranking them to distinguish between Buffalo and Control or *Tenebrio* and Control groups, respectively. (C) Venn Diagram derived from the integrative analysis. (D) Fold change Heatmap for the 11 variables that are common in the two comparisons. Green color indicates the gene expression upregulation or higher levels of the variable, while red signifies downregulation or reduced levels, compared to control. * indicates p -value < 0.05. Abbreviations utilized include D (duodenum), J (jejunum), I (ileum), AC (ascending colon), DC (descending colon), G (goblet cells) and M (total absorptive area).

RESULTS

Insect Consumption Primarily Modulates Taste Receptor Gene Expression in the Ascending Colon. To address the modulation of the abundances of the main

described bitter taste receptors located at the different intestinal locations⁶ and umami receptors, we work with the quantification of their mRNA. It allows us to run a quantitative screen of eight of them, as indicative of the potential proteins

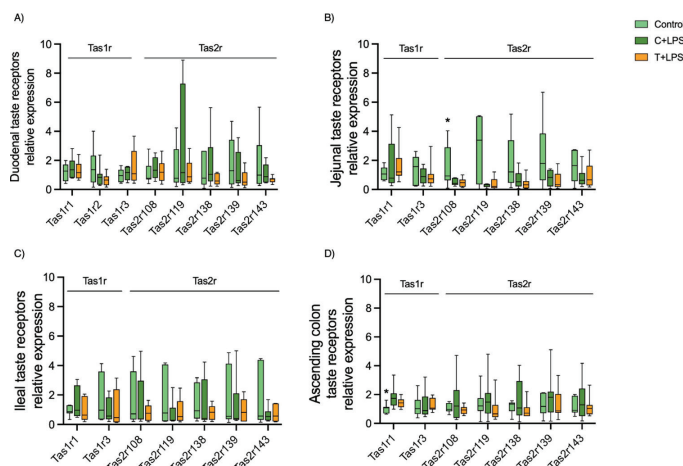


Figure 4. Relative expression of intestinal taste receptors in LPS groups. Animals were treated by 5-days LPS injection (dark green) or by LPS injection plus *Tenebrio molitor* (dark orange), or water as the vehicle (green) for 21 days. The data are presented in a box and whiskers plot. Boxes represent the median and interquartile range, while whiskers extend from the smallest to the largest values, encapsulating the full range of the data. Mann-whitney analysis was used to compare Control and T + LPS with LPS group ($n = 7\text{--}8/\text{group}$). * indicates $p < 0.05$ compared to LPS group.

to be located in the membrane to act as truly receptors for their respective ligands. In the small intestine of healthy female rats, the consumption of both insect species induced no significant changes in the relative expression of the taste receptors assayed when compared with the control group (Figure 2A–C). Taste receptors in the duodenum (Figure 2A) were not modified by initially hydrolyzed proteins from the stomach. However, the expression of umami taste receptors (Tas1r1 and Tas1r3) in the ascending colon increased when the rats were supplemented with either Buffalo or *Tenebrio* (Figure 2D). Note that at this location most protein digestion was completed. A tendency for the Tas1r1 profile to increase was also found in the jejunum when the rats were administered the Buffalo supplement (Figure 2B). Finally, with regard to bitter taste receptors, the Buffalo-supplemented group exhibited significantly lower relative expression levels of Tas2r119 and Tas2r138 in the ascending colon than did the control group (Figure 2D).

In the descending colon, we measured only Tas1r1 and Tas1r3 receptors. The gene expression of Tas1r1 in the groups under study was similar (control: 1.12 ± 0.44 ; Buffalo: 1.31 ± 0.73 ; *Tenebrio*: 1.36 ± 0.60 ; $p > 0.05$). The same pattern was observed with regard to Tas1r3 expression, levels of which between groups were similar (control: 1.06 ± 0.37 ; Buffalo: 1.31 ± 1.15 ; *Tenebrio*: 1.73 ± 0.96 ; $p > 0.05$).

Tas1R1 in the Ascending Colon Is a Discriminating Factor for Insect Consumption. To analyze the importance of taste receptors in the intestine for overall intestinal health, we used machine learning algorithms to integrate and identify which variables among the ninety-seven we analyzed distinguished between groups most effectively. We conducted this analysis under healthy conditions by pairing each insect species with the control group.

Elastic Net, PLS-DA, and Random Forest analyses identified twenty-seven key variables that distinguished between the

control and Buffalo groups. These variables were then integrated, ranked, and visually presented in the Dot Plot shown in Figure 2A. Among these variables, a striking representation of taste receptor expression across various segments of the intestine was observed. After applying the Kneedle algorithm to select a subset of the most important of these variables, we selected a total of 11. Among these top variables identified as highly discriminative between groups, the expression levels of certain taste receptors consistently stand out. Specifically, the relative expression levels of Tas1r1 in the ascending colon (Tas1r1 CA) and the jejunum (Tas1r1 J) were consistently identified by all three machine learning algorithms as key variables that effectively distinguish between the control and Buffalo groups (Figure 3A). The expression of bitter taste receptor Tas2r119 in both the jejunum and ascending colon was also identified as a significant variable by two and three methods, respectively.

When data from the control and *Tenebrio* groups were also subjected to Elastic Net, PLS-DA, and Random Forest analyses, 19 variables were selected (Figure 3B). The key discriminative factors again consistently included the relative expressions of taste receptors between these two groups. More specifically, the expression of Tas1r1 in the ascending colon and the expression of Tas2r119 in the jejunum once more emerged as pivotal variables consistently selected by all three methods for differentiation in this comparison, thereby echoing their significance from the previous analysis. To summarize these analyses, the gene expression of Tas1r1 in the ascending colon and that of Tas2r119 in the jejunum indicate that these taste receptors are highly modulated by chronic insect supplementation.

The Venn Diagram (Figure 3C) illustrates the number of variables that distinguish the Buffalo or *Tenebrio* group from the control group and the number of common variables in both insect treatments (represented in the intersection). Of the

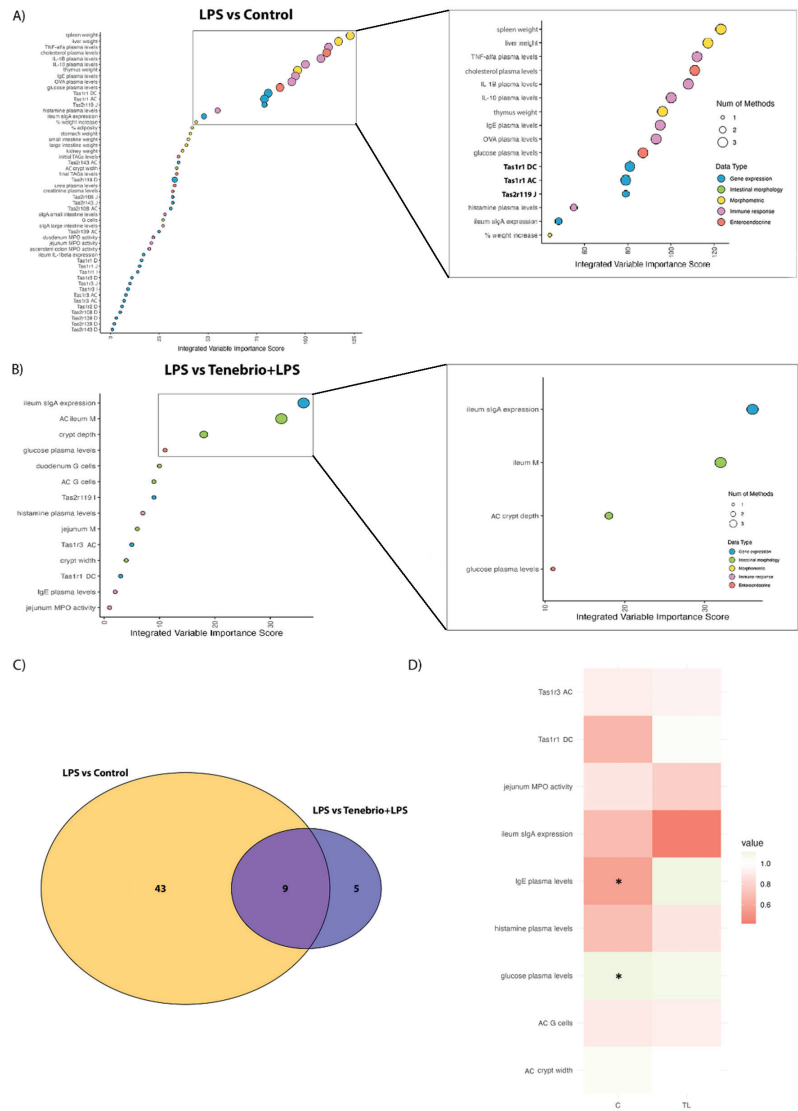


Figure 5. Principal variables distinguishing between the LPS and the control or T + LPS groups. (A and B) integrate the analysis of selected variables using machine learning algorithms, ranking them to distinguish between LPS and C or LPS and T + LPS, respectively. (C) Venn Diagram derived from the integrative analysis. (D) Fold change Heatmap for the nine variables that are common in the two comparisons. Green color indicates the gene expression upregulation or higher levels of the variable, while red signifies downregulation or reduced levels, compared to LPS. * indicates significant differences. Abbreviations utilized include D (duodenum), J (jejunum), I (ileum), AC (ascending colon), DC (descending colon), G (goblet cells), and M (total absorptive area).

35 variables that are able to distinguish the insect groups from the control group, 11 were identified as common discriminators. These variables are showcased in the Fold Change Heatmap (Figure 3D), which demonstrates the extent of

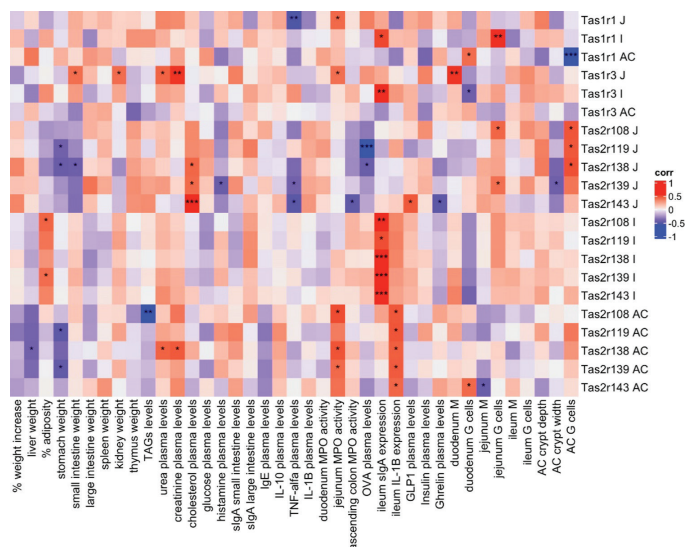


Figure 6. Heatmap of spearman correlations between taste receptor relative expression and the other parameters in *Tenebrio* and Buffalo groups and control. Red color indicates positive correlations while blue color indicates negative correlations. *, ** or *** correlation's *p*-value < 0.05, 0.01, or 0.001, respectively.

change for each variable comparing Buffalo or *Tenebrio* supplemented groups and the control group. The color of each variable indicated that all selected variables exhibit modifications (asterisks indicate those that are statistically significant) in the same direction with insect supplementation, with six of these corresponding to the relative expressions of intestinal taste receptors. Interestingly, general observations across both insect groups were an increase in the expression of colonic umami taste receptors (Tas1r1 and Tas1r3) and a consistent downregulation of some bitter taste receptor expression in the jejunum or ileum. This suggests that insect supplementation could modulate intestinal taste receptors by enhancing colonic umami receptor expression and suppressing some bitter receptor expression. Note also that the expression of Tas1r1 in the ascending colon serves as a pivotal receptor for insect consumption, underscoring its crucial role in discriminating between groups that consume insects and control groups. This significance is evident in both multivariate discriminative analysis and the statistically significant differences observed in univariate analysis between the insect-treated groups and the control group.

Modulation of the Relative Expression of Intestinal Taste Receptors under a Proinflammatory Stimulus Is Limited. We have previously shown that LPS-intestinal-induced inflammatory stimulus caused an inflammatory profile at intestinal and peripheral levels that is in some respects ameliorated by insect consumption.³⁷ In this paper, we have investigated the impact of LPS on intestinal taste receptors and explored the effects of insect consumption in this inflammatory scenario. Our results revealed that the injection of LPS had minimal impact on the assessed intestinal taste receptors, with minor significant changes observed. No differences were

observed in taste receptor expression in the duodenum (Figure 4A). In the jejunum, the relative expression of Tas2r108 was significantly lower in the LPS group than in the control group (Figure 4B). The expression of taste receptors in the ileum did not change with LPS injection (Figure 4C). In the ascending colon, the relative expression of Tas1r1 increased significantly in the LPS group (Figure 4D). Similarly, *T. molitor* supplementation in the inflammatory model did not change the expression of taste receptors in any part of the intestine compared to that in LPS-treated animals.

The relative expression of Tas1r1 in the descending colon remained unchanged after LPS injection with or without *T. molitor* administration (control: 1.12 ± 0.44 ; *Tenebrio* + LPS: 1.75 ± 0.70 ; LPS: 1.68 ± 0.61 ; $p > 0.05$). Tas1r3 expression in the descending colon also showed no significant changes between groups (control: 1.06 ± 0.37 ; *Tenebrio* + LPS: 0.97 ± 0.21 ; LPS: 1.04 ± 0.29 ; $p > 0.05$).

Gene Expression of Colonic Taste Receptors Played a Lesser Role As Key Variables for Discriminating between Rats in an Inflammatory State and Those in the Control Group. Integrative analysis revealed that, under the proinflammatory stimulus, immunological variables and morphological factors were the main parameters for distinguishing between the control group and the LPS-treated group (Figure 5A). However, of the fifty-two selected variables, 18 taste receptors played a crucial role in this differentiation. Most notably, in the subset of most important variables, the relative expression of taste receptor Tas1r1 in the colon and that of Tas2r119 in the jejunum are also particularly influential in distinguishing between the control group and the LPS-treated group. The lesser importance achieved by taste receptors for discriminating between the LPS-treated group and the control

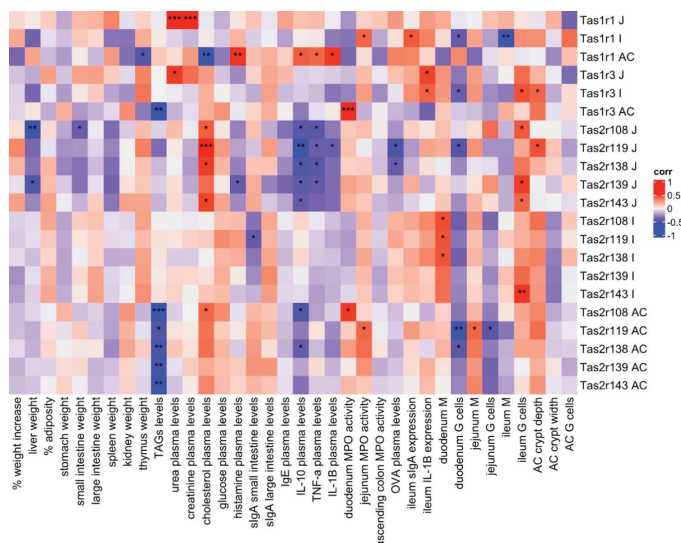


Figure 7. Heatmap of Spearman correlations between taste receptors relative expression and the other measured variables in LPS groups and control. Red color indicates positive correlations while blue color indicates negative correlations. *, ** or *** correlation's p -value <0.05, 0.01, or 0.001, respectively.

group conditioned the importance of these receptors when the effect on *Tenebrio* consumption was analyzed under this inflammatory status. In the integrative analysis of the relationship between the LPS and the *Tenebrio* + LPS groups, fewer variables were selected by the machine learning algorithms (Figure 5B). However, the relative expressions of colonic umami taste receptors Tas1r1 and Tas1r3, along with the ileal taste receptor Tas2r119, were again selected (but only by one of those algorithms).

When we combined the two integrative analyses in the Venn Diagram, nine of the fifty-two variables that differed between the control group and the LPS groups also differed between the LPS groups (Figure 5C). Thus, in this case, the Fold Change heatmap (Figure 5D) represents an increase or decrease of a variable with respect to the LPS group. It clearly shows the role of type-I taste receptors in the descending colon in distinguishing between groups. Specifically, Tas1r3 in the ascending colon exhibits a consistent direction in both the control group and the *Tenebrio* + LPS group, which indicates the potential prevention of LPS-induced alterations. Tas1r1 in the descending colon is also key in separating the LPS group from the control group, where the LPS induces an upregulation of its expression. In this context, insect consumption also increases the relative expression of Tas1r1.

Interplay between Taste Receptors and Immunological and Metabolic Markers. Integrative analysis earlier identified certain taste receptors with an important role in explaining the effects of an insect-enriched diet in both healthy and inflammatory scenarios. We then conducted Spearman correlation analysis to assess the relationships between biochemical, morphometric, or immunological parameters and taste receptor expression. We ran two separate analyses

depending on the situation: the *Tenebrio* and Buffalo groups on the one hand and the LPS-injected groups on the other. We focused especially on taste receptors in the jejunum, ileum, and ascending colon as these were identified as the primary variables by machine learning analysis.

In the homeostatic situation, the integrative analysis highlighted Tas1r1 in the ascending colon as an important taste receptor for explaining the interaction of insects with the organism. Figure 6 shows that the expression of Tas1r1 has a strong negative correlation with the percentage of goblet cells also present in the colon. Tas2r119 in the jejunum also had an important role in the integrative analysis in both insect species. We can see that the expression of Tas2r119 exhibited a negative correlation with plasmatic levels of ovalbumin, a parameter associated with the integrity of the intestinal barrier. Moreover, the expression of the ileal taste receptors demonstrates strong positive correlations with those of ileal secretory IgA: specifically, Tas2r138, -139, and -143 ($p < 0.001$).

With regard to the interplay between taste receptor expression and metabolic parameters in this homeostatic condition, plasmatic cholesterol is positively correlated with bitter taste receptors of the jejunum and, in particular, displays a highly significant correlation with Tas2r143 expression. Moreover, this receptor was also positively correlated to GLP-1 and negatively correlated with ghrelin plasmatic levels.

In the inflammatory scenario, an earlier integrative analysis also highlighted the modulation of Tas1r1 in the ascending colon. Correlation analysis related this positively with several plasma cytokines and histamine and negatively with plasma cholesterol levels (Figure 7). Moreover, analysis of the Venn diagram and Fold Change heatmap shows that *Tenebrio*

treatment prevented the LPS effect on Tas1r3 expression levels in the ascending colon. Observed is a strong positive correlation between these Tas1r3 and duodenum MPO activities and a negative correlation with final plasma TAG levels, the parameter that showed the highest number of correlations (all of them negative) with almost all taste receptors analyzed in the ascending colon. Finally, jejunal bitter taste receptors presented negative correlations with inflammatory cytokines and the intestinal permeability marker (IL-1 β , TNF- α , IL-10, and OVA levels, respectively). Interestingly, these negative correlations were significant when correlated with jejunal Tas2r119 expression. Moreover, jejunal bitter taste receptors exhibited positive correlations with final cholesterol levels, whereas negative correlations were observed between plasmatic levels of triglycerides and bitter taste receptors of the ascending colon. Finally, strong positive correlations were observed between jejunal Tas1r1 expression and creatinine and urea plasmatic levels ($p < 0.001$).

DISCUSSION

The present study reveals, for the first time, the modulation of umami and bitter taste receptor expressions with chronic protein supplementation in female rats. The integrative analysis, which considers multiple variables simultaneously and provides a more holistic perspective of the data than single-level analysis,⁴⁴ identified ascending colonic Tas1r1 expression, along with Tas1r3 and some bitter taste receptors spanning from the jejunum to the colon, as crucial variable distinguishing between the control and the insect-supplemented groups. Additionally, taste receptor expressions significantly correlated with inflammatory and metabolic parameters under both healthy and inflammatory conditions.

First, in a healthy situation, the colonic expression of Tas1r1 and Tas1r3 was upregulated upon supplementation with both Buffalo and *T. molitor*, suggesting taste receptor gene expression can be modulated by insect-derived components in the diet. These findings align with numerous studies in humans and rodents suggesting that chronic exposure to certain dietary compounds, including taste receptor agonists, may lead to changes in mRNA expression of these receptors.^{45–47} Umami taste is often associated with the presence of L-amino acids, especially glutamate and aspartate. Insects, known for their high levels of amino acids, including glutamic acid, serve as an excellent source of umami receptor ligands. In fact, glutamate and aspartate are the most abundant amino acids in the raw Buffalo flour used in this study.⁴⁸ Regarding amino acid consumption, some authors have shown that dietary glutamate increases the expression of Tas1r1 and Tas1r3 in the stomach and jejunum of piglets, along with other glutamate signaling receptors.⁴⁹ Moreover, insect protein is also rich in branched-chain amino acids (isoleucine, leucine, and valine), which have also been described to upregulate umami receptor expression and protein in porcine jejunum.⁵⁰ Therefore, considering all of these factors, increased umami taste receptor expression may be a response to the levels of amino acids in the diet reaching the gastrointestinal tract.

Interestingly, some authors have shown that, in humans and other higher animals, the intestinal secretion of CCK, a satiety hormone, can occur through the Tas1r1/Tas1r3 activation, while others have also suggested GLP-1 secretion after amino acid activation of this receptor.^{49,51} In line with this, previous findings from our research team have demonstrated an increase in plasma GLP-1 levels in rats after insect supplementation.³³

Moreover, the integrative analysis performed in this study revealed that GLP-1 is another key variable in distinguishing the animal groups that received insect supplementation. Taken together, these results provide more evidence of a possible relationship between umami receptors and hormone secretion in the intestine.

Furthermore, the bitter taste receptors selected by machine learning algorithms were mainly located in the jejunum, ileum, and ascending colon. Among these, jejunal Tas2r119 emerged as a key variable that facilitates the differentiation between the insect-supplemented groups and the control group. These results are also consistent with previous research that described the interaction of certain peptides and amino acids with human bitter taste receptors,¹² positioning Tas2r119 as particularly susceptible to insect protein consumption. Notably, our findings revealed a significant modulation of both umami and bitter taste receptors in the ascending colon, particularly evident in the colonic Tas1r1 upregulation after insect supplementation and in the Buffalo-supplemented group, which showed significantly lower expression levels of Tas2r119 and Tas2r138. These findings may indicate a specific modulation of taste receptors in the colon that is potentially influenced by the microbiota. The intestinal microbiome has been shown to interact with taste receptors, impacting their expression and function.^{52,53} Additionally, research by Borrelli et al. highlights the potential contribution of insects to this modulation,⁵⁴ as they can serve as sources of short-chain fatty acids (SCFA) known to influence taste receptor expression. SCFA-treated organoids exhibited upregulation of umami gene expression, suggesting a multifaceted mechanism involving not only amino acid composition but also microbial-derived metabolites in taste receptor modulation within the colon.⁵⁵ Moreover, recent studies have even reported a microbial-dependent regulation of Tas2r in mice subjected to a long-term high-fat diet,⁵⁶ further supporting the hypothesis that changes in microbiota composition due to dietary factors may influence taste receptor expression.

The influence of this taste receptor expression modulation on intestinal function and overall organism responses remains unclear. To gain further insights into the potential implications of the expression changes, we conducted a correlation study between the expression of taste receptors and the other evaluated variables. The correlation findings between the expression of colonic Tas1r1 and the percentage of goblet cells in the colon suggested a potential interplay with the colonic mucosal environment. Goblet cells, specialized in producing mucus, play a crucial role in maintaining intestinal health and initiating immunological responses,⁵⁷ reinforcing the idea of Tas1r1 involvement in immune function.⁵⁸ Moreover, this connection between goblet cells and Tas1r1 may be produced by the presence of this receptor in colonic tuft cells, which are involved in the immune response that can activate goblet cells.^{59,60} However, an additional explanation for this negative correlation could be attributed to the influence of insect compounds on the composition of intestinal cells. Several studies suggested that dietary components like nondigestible carbohydrates and polyphenols can promote L-cell differentiation.^{61–63} Therefore, the specific differentiation of those cells expressing Tas1r1, such as L-cells or tuft cells, could logically be related to a decrease in the percentage of goblet cells. Additionally, the positive correlation between the expression of ileal taste receptors and ileal secretory IgA is intriguing and emphasizes the role of taste receptors in the

intestinal immune response.⁶⁴ IgA acts as the first barrier on mucosa surfaces against infectious microorganisms and toxins. Similarly, antimicrobial peptides, which may be secreted by the stimulation of Tas2r,¹⁸ serve as immunomodulators in this context and may impact secretory IgA. These findings collectively set the basis for further research on the specific role of taste receptors in the context of immune response in both healthy and disease situations.

Furthermore, correlation analysis in the two conditions analyzed (healthy and inflammatory-induced animals) revealed a negative relation between the mRNA expression of Tas2r119 and intestinal permeability, also suggesting that this receptor is involved in intestinal function and barrier integrity. This association between bitter taste receptors and permeability has been explored in the context of pulmonary endothelium, where bitter taste agonists demonstrated a reduction in the LPS-induced permeability of the pulmonary endothelium *in vitro*.⁶⁵

In this study, we also aimed to analyze the effect of protein supplementation in an inflammatory model. The obtained results indicated that the impact of insect consumption under LPS-induced inflammation was more closely associated with other intestinal parameters, such as inflammation or morphometry of the intestine, rather than with the expression of taste receptors. Despite the nondecisive role of taste receptors in differentiating between insect consumption and control groups under inflammatory conditions, the LPS injection did impact the intestinal expression of taste receptors. This model, which is characterized by the production of a spectrum of cytokines that results in systemic inflammation, particularly manifests an altered physical barrier and a proinflammatory intestinal environment in the small intestine.^{40,66} In this inflammatory context, taste receptors may be affected and potentially contribute to the immune response, thus creating a feedback loop.⁶⁷ Machine learning algorithms identified 18 taste receptors that distinguish between the LPS group and the control group. Notably, colonic umami or umami-sweet taste receptors, as well as jejunal Tas2r119, again emerged as the primary contributors to group differentiation. Our univariate analysis showed that the gene expression of Tas2r either did not change or was significantly decreased in certain parts of the intestines of rats with LPS-induced inflammation. Similarly, another study in mice reported an inhibition of taste bud cell renewal after the intraperitoneal injection of LPS.⁶⁸ In contrast, a previous study that investigated the expression of some type-II taste receptors in taste buds found that injecting LPS stimulated Tas2rs expression also in mice.⁶⁹ Even with these contradictory findings, our results help to establish a connection between taste receptors and immune disturbance, as has previously been described for both Tas1r and Tas2r in humans and rodents.^{64,70}

Our correlation results (particularly in LPS-injected rats but also in healthy ones) showed negative correlations between plasmatic TNF- α , IL-1 β , and IL-10 levels, and bitter taste receptors (especially Tas2r119) in the jejunum as well as a positive correlation with colonic Tas1r1. Similarly, a study by Reynolds et al. reported an increase in Tas1r1 expression in conjunction with an immune response.²² Moreover, our study demonstrates that colonic Tas1r3 is also a key discriminator between (i) LPS-injected rats and those in the control group and (ii) rats injected with LPS alone and those also administered *Tenebrio*, showing upregulation specifically in the LPS group. This is in line with the results of the study by

Shon et al., which suggest that Tas1r3 is a mediator of intestinal inflammation in mice.⁴

Finally, interesting correlations are observed in the LPS-treated groups with regard to the biochemical variables analyzed. While final triglycerides are negatively correlated with ascending colon taste receptors, cholesterol levels are positively correlated with jejunal bitter ones. In this context, previous studies in humans and rodents have reported a possible relationship between intestinal bitter taste receptors and lipid metabolism.⁷¹ In addition, recent research has added a new dimension to this relationship by showing that cholesterol acts as an agonist for bitter taste receptors, modulating their function.^{72,73} Together, these findings highlight the intricate interplay between lipid metabolism and taste receptor signaling pathways, potentially opening up new avenues for understanding and treating metabolic diseases. Furthermore, creatinine and urea plasmatic levels correlate with jejunal umami taste receptors, suggesting possible links between umami taste perception and amino acid metabolism. Dietary glutamate and aspartate are metabolized during intestinal transport to various products, including urea metabolites.^{74,75} In this regard, previous findings from our group showed that insect supplementation in rats ameliorates LPS-altered urea levels in plasma,³⁷ reinforcing the link between L-amino acid levels reaching the jejunum and plasma urea levels. Thus, the correlations observed in our study raise the possibility that the activation of umami intestinal taste receptors could play a role in the regulation of nitrogen metabolism. All of this novel evidence poses questions about the potential systemic effects of taste receptor modulation beyond the digestive system and suggests that taste receptors can be explored as potential targets for treating disturbances.

One limitation of our study is that while we observed modifications in gene expression, these changes may not necessarily translate directly to alterations in protein levels. This is mainly related to the level of expression of these receptors and the scarce availability of technical tools to run this screening and quantify them as transmembrane proteins. Additionally, our analysis was conducted on whole intestinal tissue without specific cell-level resolution. However, it is essential to note that our study serves as an initial screening, revealing the modulation of taste receptor expression by different treatments. This preliminary investigation provides a foundation for future research to delve deeper into the most significant receptors and their specific cellular locations within the intestinal tract as well as to elucidate the underlying mechanisms involved. Further studies focusing on these aspects are crucial for a comprehensive understanding of how insect protein supplementation influences taste receptor expression and function in the gut. Additionally, identifying the specific constituents of insect flour, such as insect-specific 5-ribonucleotides, amino acids, or peptides, responsible for these effects is crucial.

In conclusion, this study demonstrates the modulation of taste receptors after various interventions in rat models. Our data postulate the expression of Tas1r1 in the ascending colon as a relevant taste receptor regulated by insect consumption. The consistency of our results across multiple analytical methods strengthens the validity of our findings, which suggest that insect supplementation or induced inflammation modified taste receptor expression, particularly colonic umami taste receptors, that could involve changes in intestinal function and systemic health. Moreover, the intricate network of correla-

tions between taste receptor expression and several physiological parameters, such as various morphological, biochemical, and inflammatory parameters, emphasizes the complexity of interactions within and beyond the gastrointestinal system. Hence, our findings can contribute to a better understanding of the complex mechanisms regulating diet-health interactions, facilitating the development of targeted nutritional interventions toward enhancing intestinal health and overall well-being. Nevertheless, further research is needed to fully elucidate the direct relationship among intestinal taste receptors, gut functions, and overall health.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Esther Rodríguez-Gallego — MoBioFood Research Group, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, 43007 Tarragona, Spain; orcid.org/0000-0002-6363-2510; Phone: +34977558188; Email: esther.rodriguez@urv.cat

Authors

Helena Segú — MoBioFood Research Group, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, 43007 Tarragona, Spain

Florijan Jalševac — MoBioFood Research Group, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, 43007 Tarragona, Spain

Mónica Lores — MoBioFood Research Group, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, 43007 Tarragona, Spain

Raül Beltrán-Debón — MoBioFood Research Group, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, 43007 Tarragona, Spain

Ximena Terra — MoBioFood Research Group, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, 43007 Tarragona, Spain; orcid.org/0000-0003-1043-5844

Montserrat Pinent — MoBioFood Research Group, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, 43007 Tarragona, Spain

Anna Ardévol — MoBioFood Research Group, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, 43007 Tarragona, Spain; orcid.org/0000-0003-0156-7538

Maria Teresa Blay — MoBioFood Research Group, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, 43007 Tarragona, Spain

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jafc.4c02408>

Funding

This research was funded by the Diputació de Tarragona and Universitat Rovira i Virgili (URV) grant number DIPTA-007 2020/26 (ESSARPI), MCIN/AEI PID2021-122636OB-I00 by ERDF "A way of making Europe", and TED2021-131783B-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by the "European Union NextGenerationEU/PRTR". H.S. was funded by the Martí i Franquès program of URV. F.J. was funded by Marie Skłodowska Curie grant agreement No 945413 and the Universitat Rovira i Virgili (URV). M.L. was funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and FSE+ grant number PRE2022-103004. M.P. and X.T. are Serra Hünter fellows.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Harry Park, a PhD Student in the Centre for Computational Biology at Duke-NUS Medical School, Singapore, for her assistance in the integrative data analysis. We also thank Niurka Llopiz, Rosa M. Pastor for the respective technical support at the URV. Additionally, our thanks extend to Àngel Ricard Escandell and Sandra Les for their time spent doing laboratory work at the beginning of this project. We are also grateful to Iberinsect for supplying us with insect flour.

REFERENCES

- (1) Bachmanov, A. A.; Bosak, N. P.; Lin, C.; Matsumoto, I.; Ohmoto, M.; Reed, D. R.; Nelson, T. M. Genetics of Taste Receptors. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20* (16), 2669.
- (2) Chao, D. H. M.; Argmann, C.; Van Eijk, M.; Boot, R. G.; Ottenhoff, R.; Van Roomen, C.; Foppen, E.; Siljee, J. E.; Unmehopa, U. A.; Kalsbeek, A.; Aerts, J. M. F. G. Impact of Obesity on Taste Receptor Expression in Extra-Oral Tissues: Emphasis on Hypothalamus and Brainstem. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, No. 29094.
- (3) Ki, S. Y.; Jeong, Y. T. Taste Receptors beyond Taste Buds. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (17), 9677.
- (4) Shon, W. J.; Song, J. W.; Oh, S. H.; Lee, K. H.; Seong, H.; You, H. J.; Seong, J. K.; Shin, D. M. Gut Taste Receptor Type 1 Member 3 Is an Intrinsic Regulator of Western Diet-Induced Intestinal Inflammation. *BMC Med.* **2023**, *21* (1), 165.
- (5) Cheled-Shoval, S. L.; Druyán, S.; Uni, Z. Bitter, Sweet and Umami Taste Receptors and Downstream Signaling Effectors: Expression in Embryonic and Growing Chicken Gastrointestinal Tract. *Poult. Sci.* **2015**, *94* (8), 1928–1941.
- (6) Descamps-Solà, M.; Vialata, A.; Jalševac, F.; Blay, M. T.; Rodríguez-Gallego, E.; Pinent, M.; Beltrán-Debón, R.; Terra, X.; Ardévol, A. Bitter Taste Receptors along the Gastrointestinal Tract: Comparison between Humans and Rodents. *Front. Nutr.* **2023**, *10*, No. 1215889.
- (7) Lang, T.; Di Pizio, A.; Risso, D.; Drayna, D.; Behrens, M. Activation Profile of TAS2R2, the 26th Human Bitter Taste Receptor. *Mol. Nutr. Food Res.* **2023**, *67* (11), No. 2200775.
- (8) Richter, P.; Sebald, K.; Fischer, K.; Behrens, M.; Schnieke, A.; Somoza, V. Bitter Peptides YFYPEL, VAPFPPEVF, and YQEPVLPVVRGPFPIIV, Released during Gastric Digestion of Casein, Stimulate Mechanisms of Gastric Acid Secretion via Bitter Taste Receptors TAS2R16 and TAS2R38. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, *2022*, 11591–11602.
- (9) Kim, M. J.; Son, H. J.; Kim, Y.; Misaka, T.; Rhyu, M.-R. Umami-Bitter Interactions: The Suppression of Bitterness by Umami Peptides via Human Bitter Taste Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *456* (2), 586–590.
- (10) Maehashi, K.; Huang, L. Bitter Peptides and Bitter Taste Receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66* (10), 1661–1671.
- (11) Karametsi, K.; Kokkinidou, S.; Ronningen, I.; Peterson, D. G. Identification of Bitter Peptides in Aged Cheddar Cheese. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (32), 8034–8041.
- (12) Kohl, S.; Behrens, M.; Dunkel, A.; Hofmann, T.; Meyerhof, W. Amino Acids and Peptides Activate at Least Five Members of the Human Bitter Taste Receptor Family. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (1), 53–60.
- (13) Jalševac, F.; Terra, X.; Rodríguez-Gallego, E.; Beltrán-Debón, R.; Blay, M. T.; Pinent, M.; Ardévol, A. The Hidden One: What We Know About Bitter Taste Receptor 39. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2022**, *13*, No. 854718.
- (14) Slack, J. P.; Brockhoff, A.; Batram, C.; Menzel, S.; Sonnabend, C.; Born, S.; Galindo, M. M.; Kohl, S.; Thalmann, S.; Ostropovici-Halip, L.; Simons, C. T.; Ungureanu, I.; Duineveld, K.; Bologna, C. G.;

- Behrens, M.; Furrer, S.; Oprea, T. I.; Meyerhof, W. Modulation of Bitter Taste Perception by a Small Molecule HTAS2R Antagonist. *Curr. Biol.* **2010**, *20* (12), 1104.
- (15) Fierro, F.; Peri, L.; Hübner, H.; Tabor-Schkade, A.; Waterloo, L.; Löber, S.; Pfeiffer, T.; Weikert, D.; Dingjan, T.; Margulis, E.; Gmeiner, P.; Niv, M. Y. Inhibiting a Promiscuous GPCR: Iterative Discovery of Bitter Taste Receptor Ligands. *Cell. Mol. Life Sci.* **2023**, *80* (4), 114.
- (16) Paniagua, M.; Villagómez-Estrada, S.; Crespo, F. J.; Pérez, J. F.; Aris, A.; Devant, M.; Solà-Oriol, D. Citrus Flavonoids Supplementation as an Alternative to Replace Zinc Oxide in Weanling Pigs' Diets Minimizing the Use of Antibiotics. *Animals (Basel)* **2023**, *13* (6), 967.
- (17) Ahmad, R.; Dalziel, J. E. G Protein-Coupled Receptors in Taste Physiology and Pharmacology. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, No. 587664.
- (18) Liszt, K. I.; Wang, Q.; Farhadipour, M.; Segers, A.; Thijs, T.; Nys, L.; Deleus, E.; van der Schueren, B.; Gerner, C.; Neuditschko, B.; Ceulemans, L. J.; Lannoo, M.; Tack, J.; Depoortere, I. Human Intestinal Bitter Taste Receptors Regulate Innate Immune Responses and Metabolic Regulators in Obesity. *J. Clin. Invest.* **2022**, *132* (3), No. e144828.
- (19) Janssen, S.; Laermans, J.; Verhulst, P. J.; Thijs, T.; Tack, J.; Depoortere, I. Bitter Taste Receptors and α -Gustducin Regulate the Secretion of Ghrelin with Functional Effects on Food Intake and Gastric Emptying. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (5), 2094–2099.
- (20) Kok, B. P.; Galmozzi, A.; Littlejohn, N. K.; Albert, V.; Godio, C.; Kim, W.; Kim, S. M.; Bland, J. S.; Grayson, N.; Fang, M.; Meyerhof, W.; Stuzdak, G.; Srinivasan, S.; Behrens, M.; Saez, E. Intestinal Bitter Taste Receptor Activation Alters Hormone Secretion and Impacts Metabolic Benefits. *Mol. Metab.* **2018**, *16*, 76–87.
- (21) Koh, G. Y.; Rowling, M. J.; Pritchard, S. K. Possible Role of Type 1 and Type 2 Taste Receptors on Obesity-Induced Inflammation. *Nutr. Rev.* **2022**, *80* (8), 1919–1926.
- (22) Reynolds, C. M.; Segovia, S. A.; Zhang, X. D.; Gray, C.; Vickers, M. H. Maternal High-Fat Diet-Induced Programming of Gut Taste Receptor and Inflammatory Gene Expression in Rat Offspring Is Ameliorated by CLA Supplementation. *Physiol. Rep.* **2015**, *3* (10), No. e12588.
- (23) Carbone, J. W.; Pasiakos, S. M. Dietary Protein and Muscle Mass: Translating Science to Application and Health Benefit. *Nutrients* **2019**, *11* (5), 1136.
- (24) Phillips, S. M.; Chevalier, S.; Leidy, H. J. Protein “Requirements” beyond the RDA: Implications for Optimizing Health. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2016**, *41* (5), S65–S72.
- (25) Munteanu, C.; Schwartz, B. The Relationship between Nutrition and the Immune System. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, No. 1082500.
- (26) Vauterin, A.; Steiner, B.; Sillman, J.; Kahiluoto, H. The Potential of Insect Protein to Reduce Food-Based Carbon Footprints in Europe: The Case of Broiler Meat Production. *J. Clean Prod.* **2021**, *320*, No. 128799.
- (27) IPIFF. *An overview of the European market of insects as feed*. <https://ipiff.org/wp-content/uploads/2021/04/Apr-27-2021-IPIFF-The-European-market-of-insects-as-feed.pdf> (accessed 2023-08–15).
- (28) Nikkha, A.; Van Haute, S.; Jovanovic, V.; Jung, H.; Dewulf, J.; Kirkovic Velickovic, T.; Ghnini, S. Life Cycle Assessment of Edible Insects (Protaetia Brevisarsis Seulensis Larvae) as a Future Protein and Fat Source. *Sci. Rep.* **2021**, *11* (1), 14030.
- (29) Turck, D.; Castenmiller, J.; De Henauw, S.; Hirsch-Ernst, K. I.; Kearney, J.; Maciuk, A.; Mangelsdorf, I.; McArdle, H. J.; Naska, A.; Pelaez, C.; Pentieva, K.; Siani, A.; Thies, F.; Tsaouri, S.; Vinceti, M.; Cubadda, F.; Frenzel, T.; Heinonen, M.; Marchelli, R.; Neuhäuser-Berthold, M.; Poulsen, M.; Prieto Maradona, M.; Schlatter, J. R.; van Loveren, H.; Ververis, E.; Knutsen, H. K. Safety of Dried Yellow Mealworm (*Tenebrio Molitor* Larva) as a Novel Food Pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal* **2021**, *19* (1), No. e06343.
- (30) Turck, D.; Bohn, T.; Castenmiller, J.; De Henauw, S.; Ildico Hirsch-Ernst, K.; Maciuk, A.; Mangelsdorf, I.; McArdle, H. J.; Naska, A.; Pelaez, C.; Pentieva, K.; Siani, A.; Thies, F.; Tsaouri, S.; Vinceti, M.; Cubadda, F.; Frenzel, T.; Heinonen, M.; Marchelli, R.; Neuhäuser-Berthold, M.; Poulsen, M.; Maradona, M. P.; Schlatter, J. R.; van Loveren, H.; Azzollini, D.; Knutsen, H. K. Safety of Frozen and Dried Formulations of the Lesser Mealworm (*Alphitobius Diaperinus* Larva) as a Novel Food Pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA).* *EFSA J.* **2022**, *20* (7), 7325.
- (31) Turck, D.; Bohn, T.; Castenmiller, J.; De Henauw, S.; Hirsch-Ernst, K. I.; Maciuk, A.; Mangelsdorf, I.; McArdle, H. J.; Naska, A.; Pelaez, C.; Pentieva, K.; Siani, A.; Thies, F.; Tsaouri, S.; Vinceti, M.; Cubadda, F.; Frenzel, T.; Heinonen, M.; Marchelli, R.; Neuhäuser-Berthold, M.; Poulsen, M.; Maradona, M. P.; Schlatter, J. R.; van Loveren, H.; Azzollini, D.; Knutsen, H. K. Safety of Partially Defatted House Cricket (*Acheta Domesticus*) Powder as a Novel Food Pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal* **2022**, *20* (5), No. e07258.
- (32) Turck, D.; Castenmiller, J.; De Henauw, S.; Hirsch-Ernst, K. I.; Kearney, J.; Maciuk, A.; Mangelsdorf, I.; McArdle, H. J.; Naska, A.; Pelaez, C.; Pentieva, K.; Siani, A.; Thies, F.; Tsaouri, S.; Vinceti, M.; Cubadda, F.; Frenzel, T.; Heinonen, M.; Marchelli, R.; Neuhäuser-Berthold, M.; Poulsen, M.; Maradona, M. P.; Schlatter, J. R.; van Loveren, H.; Azzollini, D.; Knutsen, H. K. Safety of Frozen and Dried Formulations from Migratory Locust (*Locusta Migratoria*) as a Novel Food Pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal* **2021**, *19* (7), No. e06667.
- (33) Miguéns-Gómez, A.; Sierra-Cruz, M.; Segú, H.; Beltrán-Debón, R.; Rodríguez-Gallego, E.; Terra, X.; Blay, M. T.; Pérez-Vendrell, A. M.; Pinent, M.; Ardevol, A. Administration of *Alphitobius Diaperinus* or *Tenebrio Molitor* before Meals Transiently Increases Food Intake through Enterohormone Regulation in Female Rats. *J. Sci. Food Agric.* **2023**, *103* (4), 1660–1667.
- (34) Selaedi, L.; Mbajorgu, C. A.; Mabelebele, M. The Use of Yellow Mealworm (*T. Molitor*) as Alternative Source of Protein in Poultry Diets: A Review. *Trop. Anim. Health Prod.* **2020**, *52* (1), 7–16.
- (35) Ros-Baró, M.; Casas-Agustench, P.; Diaz-Rizzolo, D. A.; Battle-Bayer, L.; Adrià-Acosta, F.; Aguilar-Martínez, A.; Medina, F. X.; Pujolà, M.; Bach-Faig, A. Edible Insect Consumption for Human and Planetary Health: A Systematic Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19* (18), 11653.
- (36) Ma, Z.; Mondor, M.; Goycoolea Valencia, F.; Hernández-Álvarez, A. J. Current State of Insect Proteins: Extraction Technologies, Bioactive Peptides and Allergenicity of Edible Insect Proteins. *Food Funct.* **2023**, *14* (18), 8129–8156.
- (37) Segú, H.; Jalševac, F.; Sierra-Cruz, M.; Feliu, F.; Movassat, J.; Rodríguez-Gallego, E.; Terra, X.; Pinent, M.; Ardevol, A.; Blay, M. T. Assessing the Impact of Insect Protein Sources on Intestinal Health and Disease: Insights from Human Ex Vivo and Rat in Vivo Models. *Food Funct.* **2024**, *15* (8), 4552–4563.
- (38) Toda, Y.; Hayakawa, T.; Itoigawa, A.; Kurihara, Y.; Nakagita, T.; Hayashi, M.; Ashino, R.; Melin, A. D.; Ishimaru, Y.; Kawamura, S.; Imai, H.; Misaka, T. Evolution of the Primate Glutamate Taste Sensor from a Nucleotide Sensor. *Curr. Biol.* **2021**, *31* (20), 4641–4649.e5.
- (39) Gil-Cardoso, K.; Comitato, R.; Ginés, I.; Ardevol, A.; Pinent, M.; Virgili, F.; Terra, X.; Blay, M. Protective Effect of Proanthocyanidins in a Rat Model of Mild Intestinal Inflammation and Impaired Intestinal Permeability Induced by LPS. *Mol. Nutr. Food Res.* **2019**, *63* (8), No. e1800720.
- (40) Ramírez, K.; Quesada-Yamasaki, D.; Fornaguera-Trías, J. A Protocol to Perform Systemic Lipopolysaccharide (Lps) Challenge in Rats Odovtos. *Int. J. Dent. Sci.* **2019**, *21* (1), 53–66.
- (41) Vdoviaková, K.; Petrovová, E.; Maloveská, M.; Krešáková, L.; Teleky, J.; Elias, M. Z. J.; Petrášová, D. Surgical Anatomy of the Gastrointestinal Tract and Its Vasculature in the Laboratory Rat. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2016**, *2016*, No. 2632368.
- (42) González-Quilen, C.; Gil-Cardoso, K.; Ginés, I.; Beltrán-Debón, R.; Pinent, M.; Ardevol, A.; Terra, X.; Blay, M. T. Grape-Seed Proanthocyanidins Are Able to Reverse Intestinal Dysfunction and Metabolic Endotoxemia Induced by a Cafeteria Diet in Wistar Rats. *Nutrients* **2019**, *11*, 979.

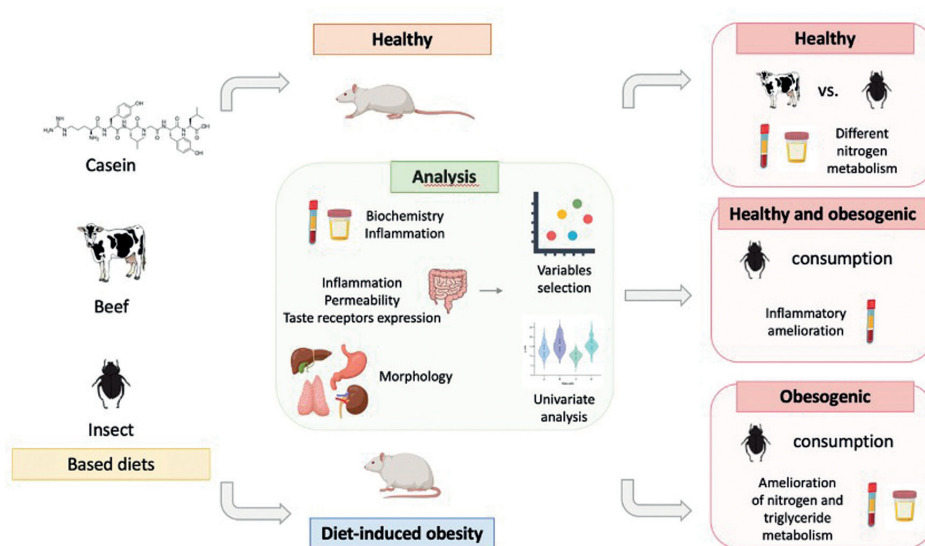
- (43) Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25* (4), 402–408.
- (44) Wu, C.; Zhou, F.; Ren, J.; Li, X.; Jiang, Y.; Ma, S. A Selective Review of Multi-Level Omics Data Integration Using Variable Selection. *High Throughput* **2019**, *8* (1), 4.
- (45) Widmayer, P.; Küper, M.; Kramer, M.; Königsrainer, A.; Breer, H. Altered Expression of Gustatory-Signaling Elements in Gastric Tissue of Morbidly Obese Patients. *Int. J. Obes (Lond)* **2012**, *36* (10), 1353.
- (46) Smith, N. J.; Grant, J. N.; Moon, J. I.; So, S. S.; Finch, A. M. Critically Evaluating Sweet Taste Receptor Expression and Signaling through a Molecular Pharmacology Lens. *FEBS J.* **2021**, *288* (8), 2660–2672.
- (47) Shabbandi, A. A.; Choo, E.; Dando, R. Receptor Regulation in Taste: Can Diet Influence How We Perceive Foods? *J. 2018* **2018**, *1* (1), 106–115.
- (48) Accardo, F.; Miguéns-Gómez, A.; Lolli, V.; Faccini, A.; Ardévol, A.; Terra, X.; Caligiani, A.; Pinent, M.; Sforza, S. Molecular Composition of Lipid and Protein Fraction of Almond, Beef and Lesser Mealworm after in Vitro Simulated Gastrointestinal Digestion and Correlation with the Hormone-Stimulating Properties of the Digesta. *Food Res. Int.* **2022**, *158*, No. 111499, DOI: 10.1016/j.foodres.2022.111499.
- (49) Zhang, J.; Yin, Y.; Shu, X. G.; Li, T.; Li, F.; Tan, B.; Wu, Z.; Wu, G. Oral Administration of MSG Increases Expression of Glutamate Receptors and Transporters in the Gastrointestinal Tract of Young Piglets. *Amino Acids* **2013**, *45* (5), 1169–1177.
- (50) Tian, M.; Heng, J.; Song, H.; Zhang, Y.; Chen, F.; Guan, W.; Zhang, S. Branched Chain Amino Acids Stimulate Gut Satiety Hormone Cholecystokinin Secretion through Activation of the Umami Taste Receptor T1R1/T1R3 Using an in Vitro Porcine Jejenum Model. *Food Funct* **2019**, *10* (6), 3356–3367.
- (51) Iwatsuki, K.; Torii, K. Peripheral Chemosensing System for Tastants and Nutrients. *Curr. Opin Endocrinol Diabetes Obes* **2012**, *19* (1), 19–25.
- (52) Covasa, M.; Stephens, R. W.; Todorean, R.; Cobuz, C. Intestinal Sensing by Gut Microbiota: Targeting Gut Peptides. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2019**, *10* (FEB), 82.
- (53) Leung, R.; Covasa, M. Do Gut Microbes Taste? *Nutrients* **2021**, *13* (8), 2581.
- (54) Borrelli, L.; Coretti, L.; Dipineto, L.; Bovera, F.; Menna, F.; Chiariotti, L.; Nizza, A.; Lembo, F.; Fioretti, A. Insect-Based Diet, a Promising Nutritional Source, Modulates Gut Microbiota Composition and SCFAs Production in Laying Hens. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 1–11.
- (55) Shackley, M.; Ma, Y.; Tate, E. W.; Brown, A. J. H.; Frost, G.; Hanyaloglu, A. C. Short Chain Fatty Acids Enhance Expression and Activity of the Umami Taste Receptor in Enterendocrine Cells via a Gai/o Pathway. *Front. Nutr.* **2020**, *7*, No. 568991.
- (56) Caremoli, F.; Huynh, J.; Lagishetty, V.; Markovic, D.; Braun, J.; Dong, T. S.; Jacobs, J. P.; Sternini, C. Microbiota-Dependent Upregulation of Bitter Taste Receptor Subtypes in the Mouse Large Intestine in High-Fat Diet-Induced Obesity. *Nutrients* **2023**, *15* (19), 4145.
- (57) Gustafsson, J. K.; Johansson, M. E. V. The Role of Goblet Cells and Mucus in Intestinal Homeostasis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **2022**, *19* (12), 785–803.
- (58) Dong, G.; Boothe, K.; He, L.; Shi, Y.; McCluskey, L. P. Altered Peripheral Taste Function in a Mouse Model of Inflammatory Bowel Disease. *Res. Sq.* **2023**, rs.3.rs-3304297 DOI: 10.21203/rs.3.rs-3304297/v1.
- (59) Schneider, C.; O'Leary, C. E.; Locksley, R. M. Regulation of Immune Responses by Tuft Cells. *Nat. Rev. Immunol* **2019**, *19* (9), 584.
- (60) Burclaff, J.; Bliton, R. J.; Breau, K. A.; Ok, M. T.; Gomez-Martinez, L.; Ranek, J. S.; Bhatt, A. P.; Purvis, J. E.; Woosley, J. T.; Magness, S. T. A Proximal-to-Distal Survey of Healthy Adult Human Small Intestine and Colon Epithelium by Single-Cell Transcriptomics. *Cell Mol. Gastroenterol Hepatol* **2022**, *13* (5), 1554–1589.
- (61) Petersen, N.; Reimann, F.; Bartfeld, S.; Farin, H. F.; Ringnald, F. C.; Vries, R. G. J.; Van Den Brink, S.; Clevers, H.; Gribble, F. M.; De Koning, E. J. P. Generation of L Cells in Mouse and Human Small Intestine Organoids. *Diabetes* **2014**, *63* (2), 410–420.
- (62) Cani, P. D.; Hoste, S.; Guiot, Y.; Delzenne, N. M. Dietary Non-Digestible Carbohydrates Promote L-Cell Differentiation in the Proximal Colon of Rats. *Br. J. Nutr.* **2007**, *98* (1), 32–37.
- (63) Casanova-Martí, A.; González-Abuín, N.; Serrano, J.; Blay, M. T.; Terra, X.; Frost, G.; Pinent, M.; Ardévol, A. Long Term Exposure to a Grape Seed Proanthocyanidin Extract Enhances L-Cell Differentiation in Intestinal Organoids. *Mol. Nutr Food Res.* **2020**, *64* (16), No. 2000303.
- (64) Turner, A.; Chijoff, E.; Veysey, M.; Keely, S.; Scarlett, C. J.; Lucock, M.; Beckett, E. L. Interactions between Taste Receptors and the Gastrointestinal Microbiome in Inflammatory Bowel Disease. *J. Nutr Intermed Metab* **2019**, *18*, No. 100106.
- (65) Kertesz, Z.; Harrington, E. O.; Braza, J.; Guarino, B. D.; Chichger, H. Agonists for Bitter Taste Receptors T2R10 and T2R38 Attenuate LPS-Induced Permeability of the Pulmonary Endothelium in Vitro. *Front. Physiol.* **2022**, *13*, No. 794370.
- (66) Ghosh, S. S.; Wang, J.; Yannie, P. J.; Ghosh, S. Intestinal Barrier Dysfunction, LPS Translocation, and Disease Development. *J. Endocr Soc.* **2020**, *4* (2), No. bvy039.
- (67) Goodman, J. R.; Dando, R. To Detect and Reject, Parallel Roles for Taste and Immunity. *Curr. Nutr Rep* **2021**, *10* (2), 137.
- (68) Cohn, Z. J.; Kim, A.; Huang, L.; Brand, J.; Wang, H. Lipopolysaccharide-Induced Inflammation Attenuates Taste Progenitor Cell Proliferation and Shortens the Life Span of Taste Bud Cells. *BMC Neurosci* **2010**, *11*, 72.
- (69) Lin, C.; Jyotaki, M.; Quinlan, J.; Feng, S.; Zhou, M.; Jiang, P.; Matsumoto, I.; Huang, L.; Ninomiya, Y.; Margolskee, R. F.; Reed, D. R.; Wang, H. Lipopolysaccharide Increases Bitter Taste Sensitivity via Epigenetic Changes in Tas2r Gene Clusters. *iScience* **2023**, *26* (6), No. 106920.
- (70) Welcome, M. O.; Dogo, D.; Mastorakis, N. E. Cellular Mechanisms and Molecular Pathways Linking Bitter Taste Receptor Signalling to Cardiac Inflammation, Oxidative Stress, Arrhythmia and Contractile Dysfunction in Heart Diseases. *Inflammopharmacology* **2023**, *31* (1), 89–117.
- (71) Safe, S. H.; Kato, E.; Oshima, S. Association of Bitter Taste Receptors with Obesity and Diabetes and Their Role in Related Tissues. *Receptors* **2023**, *2* (4), 251–263.
- (72) Di Pizio, A. A Bitter Taste Receptor Activated in a Surprising Way. *Nature* **2024**, *628* (8008), 506–507.
- (73) Kim, Y.; Gumpfer, R. H.; Liu, Y.; Kocak, D. D.; Xiong, Y.; Cao, C.; Deng, Z.; Krumm, B. E.; Jain, M. K.; Zhang, S.; Jin, J.; Roth, B. L. Bitter Taste Receptor Activation by Cholesterol and an Intracellular Tastant. *Nature* **2024**, *628* (8008), 664–671.
- (74) Windmueller, H. G.; Spaeth, A. E. Respiratory Fuels and Nitrogen Metabolism in Vivo in Small Intestine of Fed Rats. Quantitative Importance of Glutamine, Glutamate, and Aspartate. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255* (1), 107–112.
- (75) Tomé, D. The Roles of Dietary Glutamate in the Intestine. *Ann. Nutr. Metab.* **2018**, *73* (SupplS), 1S–20.

Part 3

Anàlisi del consum crònic d'insectes com a font única de proteïnes sobre la salut intestinal i el benestar general, en condicions saludables i patològiques

Manuscrit 3

Examinar l'impacte de les dietes basades en insectes en la salut intestinal i en general, en rates sanes i obeses induïdes per la dieta.



Examining the Impact of Insect-Based Diets on Intestinal and Overall Health, in Healthy and Diet-Induced Obese Rats

Helena Segú, Mònica Lores, Oria Soler, Marina Colom-Pellicer, Florijan Jalševac, Raúl Beltrán-Debón, Ximena Terra, Montserrat Pinent, Anna Ardévol, Esther Rodríguez-Gallego*, Maria Teresa Blay

MoBioFood Research Group, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, c/Marcel·lí Domingo n°1, 43007 Tarragona, Spain.

*Correspondance: esther.rodriquez@urv.cat; Tel.: +34977558188

Abstract

Insects have been proposed as a promising alternative protein source, meeting essential amino acid requirements, and offering environmental advantages over conventional sources. They also contain bioactive compounds that could exert health benefits. Thus, the present study aimed to investigate the effects of chronic consumption of insect-based diets in female rats compared to traditional protein sources, both in healthy and obesogenic conditions. To achieve this objective, female Wistar rats were randomly assigned to one of five groups. Each group was fed a different diet for a period of four weeks. Then the groups were divided as follows: a casein-based diet (Control, n=8), a beef-based diet (Beef, n=8), or an insect-based diet (Insect, n=8), in the healthy condition. Furthermore, in the obesogenic condition, the rats were subjected to a 12-week cafeteria diet, as well as to the control diet (CAF, n=8) or the insect diet (CAF-I, n=8). We employed an integrative analytical approach to identify the most significant variables that differentiate between the groups under investigation. These variables included metabolic, inflammatory, morphologic, and intestinal taste receptors parameters. The results revealed that the consumption of insects as a unique source of protein is safe and may confer potential health benefits. The consumption of insect-based diet result in a different nitrogen and lipid metabolism, and lower proinflammatory profile than the consumption of other diets, in health and obesogenic status. Furthermore, the insect consumption can mitigate the alterations in urea and lipids induced by the cafeteria diet, thereby highlighting their potential as a viable alternative protein source.

Keywords: insect-based diet, protein, healthy, obesogenic, intestine.

Introduction

Insects have emerged as high-quality protein source, that met the requirements of essential amino acids content, and contain unsaturated fatty acids and micronutrients ^{1,2}. Moreover, the quantity and quality of protein is comparable to the conventional animal- and plant-based protein-dense foods, such as beef, eggs, or soy ³. Their production requires less land and water use, emits lower greenhouse gas emissions, while exhibit high feed conversion efficiency, making them a cost-effective and sustainable alternative to traditional livestock ⁴. Therefore, insects represent a promising sustainable alternative protein source to help meet the food supply challenge posed by population growth, providing a rich source of essential nutrients while mitigating the environmental impacts associated with traditional animal-based protein production ⁵.

In addition to being consumed as food, insects have been described as containing bioactive compounds that exert health benefits. These include antioxidant, antihypertensive, antimicrobial activity, and immunomodulatory effects ⁶. While some studies have investigated the health effects of incorporating insect protein into animal diets, research into the complete replacement of protein intake with insect sources remains limited. Furthermore, few studies have directly compared the effects of insect consumption as a replacement for conventional meat intake in vivo, with most focusing on amino acid absorption and muscle protein synthesis ^{7,8}. On the other hand, some studies investigating the partial replacement of conventional protein sources with insects, indicated changes in the gut and systemic metabolism. In addition, partial replacement of meat with insect protein in healthy rats showed changes in the intestinal microbiome and endogenous metabolism, likely due to insect protein residues reaching the colon ³. One study also reported improvements in metabolic health, including reduced lipid levels, in obese Zucker rats when casein was replaced with protein-rich insect powder ⁹. In our previous study in rats, which consisted of a low-dose of insect supplementation in both healthy and LPS-induced inflammatory conditions, we observed significant improvements in various parameters affected by LPS-induced disturbances, promoting overall health and alleviating some of the associated disruptions ¹⁰. Thus, the present article would primarily assess the impact of insect as a unique source of protein in both healthy and pathological situations.

Western dietary patterns, characterized by high consumption of dairy products, meat, and eggs; often exceed recommended dietary thresholds for sugars, saturated fats, and cholesterol ¹¹, contributing to chronic inflammatory diseases, such as obesity, diabetes, and some gastrointestinal diseases as inflammatory bowel disease ¹². These diets have been related to an increased intestinal

permeability, intestinal dysbiosis and disturbed inflammatory and metabolic response. Dietary and lifestyle changes are the major recommendations to mitigate or reverse these effects ¹³, with growing interest in functional foods and bioactive ingredients with anti-inflammatory and weight-loss properties, or some other beneficial effects such as the improvement of gut microbiota composition ¹⁴. In this context, insects have been postulated as a promising protein source of protein rich in bioactive compounds, offering potential application in the prevention and management of chronic diseases ¹⁵. In this sense, a study involving obese mice demonstrated a reduction in body weight and metabolic amelioration when consumed mealworm-based diet, suggesting that the consumption of mealworms could confer health benefits to obese patients ¹⁶.

Although some studies have indicated potential benefits of insect consumption on metabolic, inflammatory and intestinal health, further research is required in both healthy and pathological conditions. This should involve the use of different insect species and the analysis of a wider range of health parameters ^{17–19}. Therefore, the main objective of the present study was to analyse the effects of insect-based diet on general health and, particularly, in the intestinal tract in both healthy and pathological conditions, comparing them with casein and beef-based diet. The evaluated morphometric data, biochemical and inflammatory plasma parameters, and intestinal inflammatory and taste receptor expression were analysed using machine learning algorithms to identify the most significant variables affected by each diet.

Materials and methods

Diets

The diets were prepared by IRTA. in such a way that the nutritional composition was approximately the same in all of them (supplementary table 1). In this sense, casein, beef or insect powder were used to prepare each diet and obtain the same amount of protein. The other nutrients were balanced to ensure that the diets were nutritionally comparable.

Cafeteria (CAF) diet included milk with sugar, sausages, carrot, bacon, biscuits with pâté, and muffins *ad libitum*, which induces hyperphagia.

Experimental design

A total of 40 six-week-old RccHan: WIST female rats (Janvier, Castellar del Vallès, Spain) spent an adaptation period of 14 days in the Universitat Rovira Virgili animal facility under standard

conditions. They were caged in pairs at 22 °C with a standard 12-hour light-dark cycle, ventilation, ad libitum access to tap water and a standard Teklad diet (Cat No: Teklad 2014, Envigo++, Barcelona, Spain).

After this acclimation period, they were individualized and randomly distributed into five experimental groups (n=8). Of these groups, three represented healthy conditions, while the remaining group represented pathological conditions, as described below:

Healthy condition:

- Control group: fed a diet in which the protein content was casein.
- Beef group: fed a diet in which the protein content was obtained from beef powder.
- Insect group: fed a diet in which the protein content was obtained from insect (*Alphitobius diaperinus*) powder.

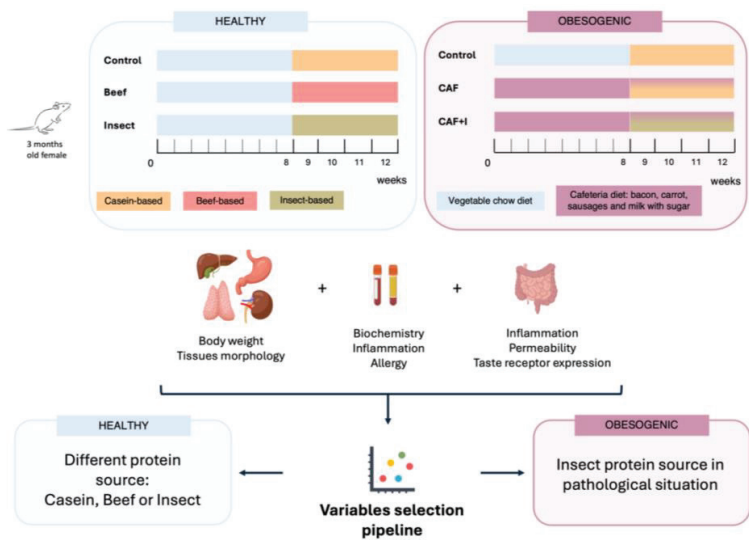
Obesogenic condition:

- Group CAF: consumed cafeteria diet plus the control diet.
- Group CAF-I: consumed cafeteria diet plus insect-based diet.

In this condition, the control group was used as a control in the subsequent data analysis.

During 8- weeks, CAF and CAF-I groups were fed with cafeteria diet, while the other three groups received a standard chow diet. After this period, each group was transitioned to its respective specific protein-based diet for four weeks. The CAF group continued on the cafeteria diet, while the CAF-I group received both the cafeteria diet and the insect-based diet. The experimental design is shown in Figure 1.

Figure 1. Experimental design.



During the study, body weight was measured once a week, and the health status of the animals was regularly monitored for cleanliness, general physical appearance, faecal consistency, and stress symptoms. The food intake was also measured daily when the dark cycle finished, and the active phase of the animal began. In the last week of experiment, urine sampling was performed, and intestinal permeability test was carried out (oral given ovalbumin).

At the end of the experiment, the animals were euthanised by decapitation. Some of main organs (right kidney, liver, spleen, thymus, brown adipose tissue, small and large intestine) were excised, weighed, and immediately frozen in liquid nitrogen. White abdominal adipose tissue (WAT) from the mesenteric, retroperitoneal and epididymal locations was excised and weighed to calculate the percentage of adiposity. Prior to intestinal processing, intestinal and colonic lavage fluids were collected with approximately 4ml of PBS, and frozen at -80°C for analysis of the mucosal inflammatory response. Fat was then removed, and according to the intestinal segment described by Vdoviaková et al. 2015¹⁷, samples from the duodenum, jejunum, ileum, ascending colon, and descending colon were demarcated. In the jejunum, ileum, and ascending colon, the relative gene expression of some selected taste receptors (tas1r and tas2r), and inflammation-related genes was analysed.

Blood was collected with EDTA as anticoagulant. Plasma was obtained by centrifugation at 1500 g for 15 min at 4°C and frozen immediately at -80 °C for future parameter quantification. All

procedures were approved by the GENCAT Animal Experimentation Committee (number 11817). The biochemical, inflammatory, and allergenic markers were analysed in plasmatic samples.

Biochemical analysis

Colorimetric kits from QCA (Tarragona, Spain), Materlab (Madrid, Spain) were used to determine the following plasma biochemical parameters: total cholesterol (QCA, Ref 995282), glucose (QCA, Ref. 998282), triacylglycerols (TAGs) (QCA, Ref 992330); as well as plasmatic and urine levels of urea (QCA, Ref.993648). Non-esterified fatty acid (NEFA) levels were also assessed by colorimetry (Wako, Ref. 270-77000). Commercial ELISA kit was used to quantify plasma levels of insulin (Millipore, Madrid, Spain).

Analyses of intestinal barrier and immune response including allergy

The ovalbumin (OVA) test was used to determine intestinal permeability ¹⁸. These analyses were carried out using Ovalbumin ELISA kits (MBS2000240) from MyBioSource (San Diego, CA, USA).

Plasma levels of total IgE and histamine were measured as biomarkers of allergy, while plasma levels of IL-10, TNF- α and IL-1 β were determined as inflammatory cytokine markers. All of them were analysed by ELISA kits from Elabscience (Texas, United States): IgE (E-EL-R0517), histamine (E-EL-0032), IL-10 (E-EL-R0016), TNF- α (E-EL-R2856), IL-1 β (E-ELL-R0012) and performed according to the manufacturer's instructions.

Secretory IgA (sIgA) levels were measured in small and large intestinal lavage fluids using the ELISA kit from MyBioSource (MBS9711882).

Intestinal gene expression

Total RNA and cDNA were obtained as previously reported ¹⁹. Quantitative PCR amplification was performed using specific TaqMan® probes for the sIgA inducing protein (Rn01406210_s1), IL-1 β (Rn00580432_m1), Tas1r1 (Rn01516038_m1), Tas1r3 (Rn00590759_g1), Tas2r108 (Rn02396427_s1), Tas2r119 (Rn00576950_s1), Tas2r138 (Rn04218919_s1) and PPIA (cyclophilin) (Rn00690933_m1) genes. The relative expression of each gene was compared with the control group using the 2- $\Delta\Delta$ Ct method and with the PPIA gene as a reference.

Statistical analysis

Integrative Analysis and Variable Selection

An integrative analysis of the forty-seven analysed variables was carried out. Machine learning algorithms (Elastic Net, Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), and Random Forest (RF)) were used to generate a set of scores that reflected the importance of variables in distinguishing between groups, as previously described (article accepted to be published in Journal of Agricultural and Food Chemistry).

As mentioned before, our experimental design involves two different scenarios: one with healthy female rats, including Control, Beef and Insect; and the other with rats under obesogenic conditions, including the cafeteria groups (CAF, CAF-I). Consequently, we performed two separate analyses, and the algorithms were applied in consideration of these two scenarios: (1) comparison of Control, Beef, and Insect, and (2) comparison of Control and CAF+I with CAF. Therefore, this approach allowed us to examine the effects of insect consumption in (1) a healthy scenario, and in (2) a diet-induced obesogenic status.

A Venn diagram was then created integrating the results of the comparisons in each scenario. The results of the Venn diagram in the obesogenic status were visualised by a fold change heat map, which describes how much the variable changes between two conditions as well as the direction of the change. The fold change of selected variables was calculated as A/B , where A is the mean of the CAF or CAF-I variable and B is the mean of the control or CAF, respectively.

Univariate analysis

A normality test was conducted for each group using the Shapiro-Wilk test. Univariate statistical differences were assessed by Tukey's multiple comparison test between the Control, Beef and Insect groups; or Mann-Whitney U test between the Control, CAF and CAF-I groups. Data are presented as mean $\pm$ SEM and were analysed with the XLSTAT 2023 statistical software (Addinsoft, USA). Mean differences were considered statistically significant if $p < 0.05$.

Results

Healthy inflammatory, metabolic and intestinal profile of insect consumption as a unique source of protein in a healthy situation

We used machine learning algorithms to integrate and identify, among the forty-seven variables analysed, the key variables that most effectively discriminated between the groups according to the of the protein intake (casein as control, beef or insect). The analysis was performed by pairing the groups.

Elastic Net, PLS-DA and Random Forest analyses identified eight key variables that discriminated between control and insect groups. These variables were then integrated, ranked, and visually presented in the plot shown in Figure 2A. In this sense, we could see that the most important variables (the ones selected by more than one method) for discriminate between casein and insect consumption were principally immune or allergenic related parameters, and taste receptor gene expression. On the other hand, ten variables discriminated between control and beef groups which included not only immune related parameters and taste receptor gene expression, but also metabolic-related variables (Figure 2B). Furthermore, the integrative analysis of beef and insect comparison identified a greater number of variables, twenty-six in total. Once again, allergenic, immunological and metabolic variables were identified among the most important. However, the algorithms also selected two morphometric variables that were related to metabolic status: the percentage of adipose tissue and the percentage of body weight gain (Figure 2C).

In order to integrate all this information, we performed a Venn diagram (Figure 2D) which allowed us to focus on the variables selected by more than one method and in more than one comparison based on protein source.

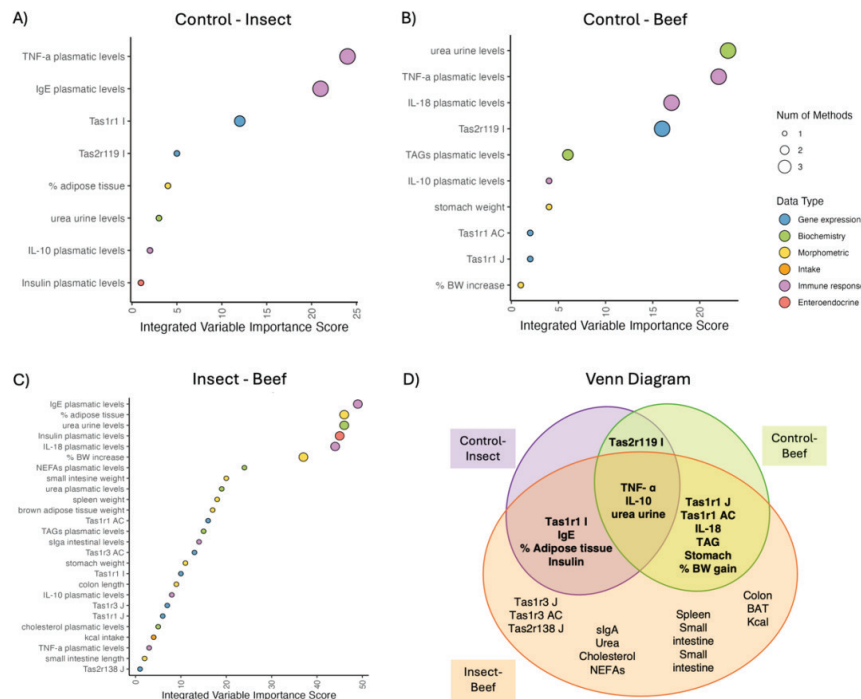


Figure 2. Principal variables distinguishing between the Control, Beef and Insect groups. Graphs integrate the analysis of selected variables using machine learning algorithms, ranking them to distinguish between A) Control and Insect groups, B) Control and Beef groups, and C) Insect and Beef groups. D) Represents Venn Diagram that integrate A), B) and C) graphs; where each ellipse represents each comparison made, and the overlaps between ellipses include the variables selected in more than one comparison. Bold type variables are the ones selected in more than one comparison. Abbreviations were used to describe: J, jejunum; I, ileum; AC, ascending colon; OVA, ovalbumin; BW, body weight.

Among the metabolic parameters, urinary urea levels were selected for the three comparisons. Univariate analysis showed that urinary urea decreased in rats consuming the beef-based diet compared to the control group (Figure 3A). Given the importance of this variable we also compared plasma urea levels between groups (although it was not a selected as a key variable) and calculated the ratio of urine to plasma levels to obtain more information about this change. Plasma urea levels decreased in the insect group compared to the beef group (Figure 3B), while the ratio of urine to plasma levels was significantly lower in the beef group compared to the control (Figure 3C). As can be seen in the Venn diagram, other metabolic variables that were important in distinguishing between groups were triglycerides and plasma insulin. However, in this case they were only selected in two of the comparisons. Univariate analysis showed that triglycerides were increased in beef compared to

the control group (Figure 3D). On the other hand, insulin did not change between groups, as was the case for the other biochemical parameters (Supplementary Table 2).

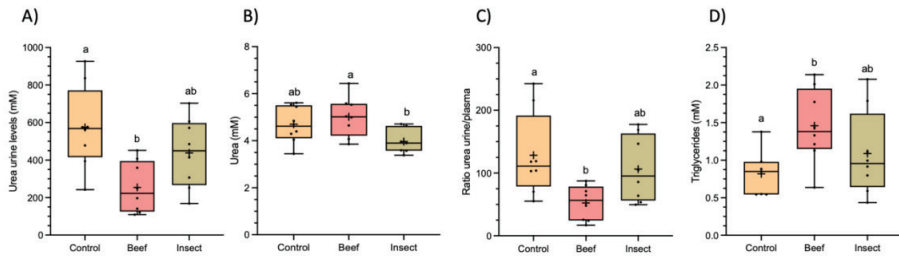


Figure 3. Biochemical and metabolic variables selected in integrative analysis. The data are presented in a box and whiskers plot. Boxes represent the median and interquartile range, while whiskers extend from the smallest to the largest values, encapsulating the full range of the data (n=7/8). Different letters indicate differences using Tukey's multiple comparison test (p < 0.05).

The selected plasmatic immune and allergenic variables included TNF- α , IgE, IL-18, and IL-10. However, only TNF- α plasmatic levels were found to be significantly decreased in animals consuming the insect diet compared to the control (Figure 4A). No significant differences were observed in the other inflammatory variables analysed (Figure 4B-D and Supplementary Table 3).

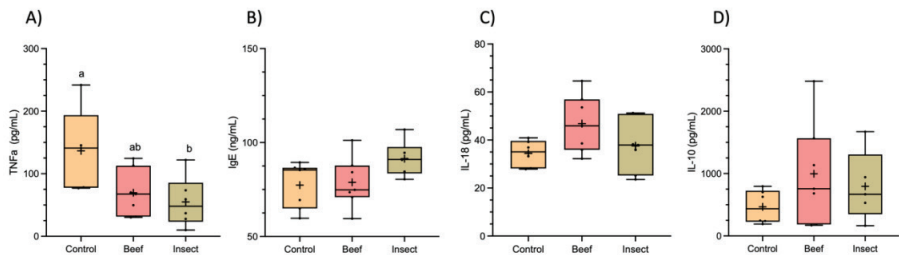


Figure 4. Inflammatory and allergenic variables selected in integrative analysis. The data are presented in a box and whiskers plot. Boxes represent the median and interquartile range, while whiskers extend from the smallest to the largest values, encapsulating the full range of the data (n=7/8). Different letters indicate differences using Tukey's multiple comparison test (p < 0.05).

The paired integrative analysis also selected some morphometric variables. The percentage of adipose tissue and body weight and stomach weight were the main variables selected by machine learning algorithms in more than one comparison. However, in the univariate analysis, none of these

variables showed significant differences between groups (Table 1), as was the case for the other morphometric parameters (Supplementary Table 4).

Table 1. Morphological parameters analysed in Control, Beef and Insect groups. Results are presented as the mean $\pm$ SEM (n=7/8).

	Control	Beef	Insect
Body weight gain (%)	23.4 $\pm$ 2.91	26.7 $\pm$ 2.65	21.9 $\pm$ 3.31
Adipose tissue (%)	5.80 $\pm$ 0.39	5.91 $\pm$ 0.47	4.87 $\pm$ 0.24
Stomach weight (g)	1.20 $\pm$ 0.02	1.26 $\pm$ 0.04	1.21 $\pm$ 0.04

Finally, regarding the expression of taste receptor genes, ileal *tas1r1* and *tas2r119*, as well as the relative expression of colonic and jejunal *tas1r1*, were the most important selected parameters discriminating between healthy rats. In this case, only *tas2r119* expression in the ileum showed a significant downregulation in the beef group compared to the control group (Figure 5A). Although selected by machine learning in more than one comparison, *tas1r1* gene expression in different locations did not show significant changes between groups (Figure 5B-D). The other *tas1r* and *tas2r* expressions assessed also did not change (Supplementary Figure 1).

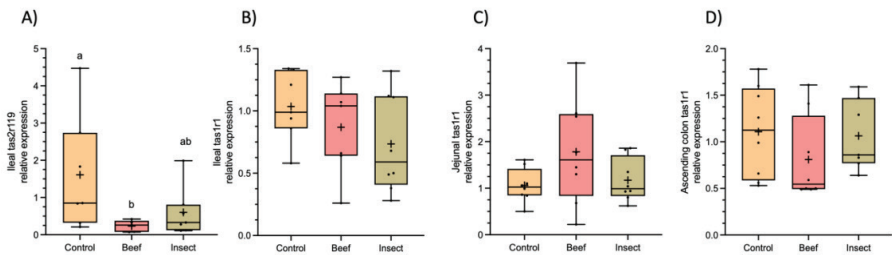


Figure 5. Taste receptor expression that was selected by integrative analysis. The data are presented in a box and whiskers plot. Boxes represent the median and interquartile range, while whiskers extend from the smallest to the largest values, encapsulating the full range of the data (n=7/8). Different letters indicate differences using Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$).

Protective immunometabolic effects of the consumption of insects in a diet-induced obesogenic state

From the total of forty-seven variables analysed in the obesogenic condition induced by the cafeteria diet, we again selected those that better differed between groups using machine learning

algorithms. In this case, the CAF group was compared with the control group to see which variables were more susceptible to change by the cafeteria diet, and with the CAF-I group to observe the effect of insect consumption in this pathological condition.

According to the integrative analysis (Figure 6A), twenty parameters were important to indicate the presence of the pathological situation induced by 12 weeks of cafeteria consumption in rats. As expected, the most important variables were total caloric intake, morphometric variables related with adiposity and body weight, insulin secretion and inflammatory variables.

When comparing the groups of rats the consumed cafeteria diet with those that also received an insect-based diet, a total of twenty-two variables discriminated between insect and non-insect consumption (figure 6B). Among several immune, morphometric and biochemical parameters, the relative expression of intestinal taste receptors also gained importance for indicate the insect consumption.

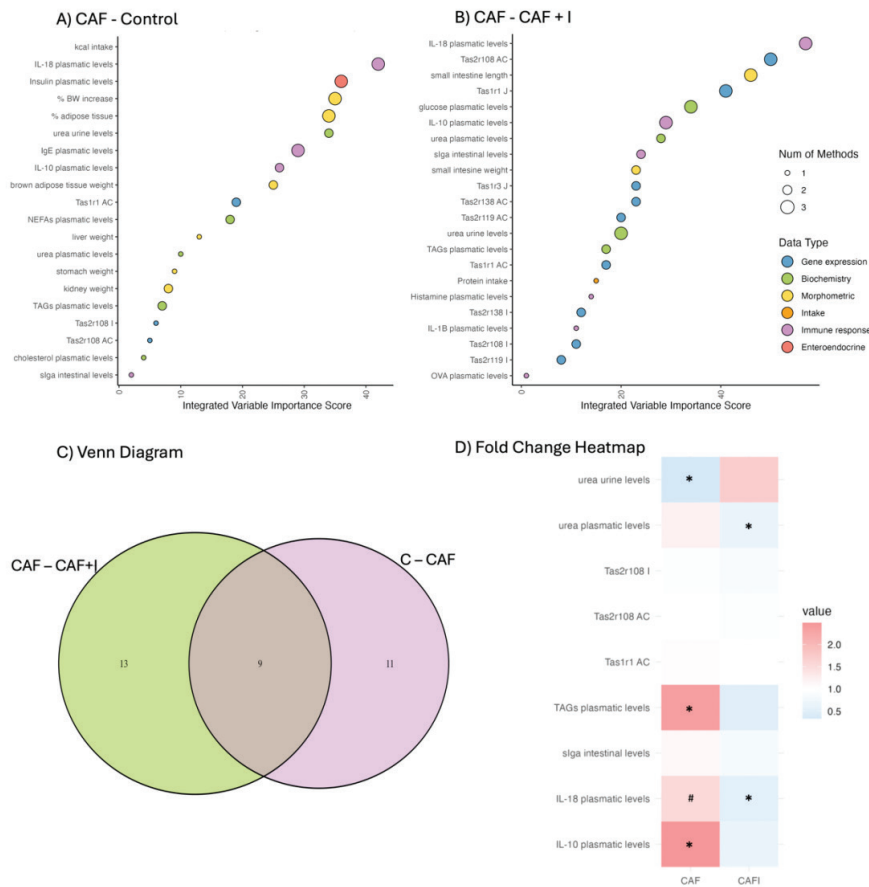


Figure 6. Principal variables distinguishing between the CAF group and Control or CAF+I. A) and B) integrate the analysis of selected variables using machine learning algorithms, ranking them to distinguish between CAF and Control or CAF+I, respectively. Abbreviations were used to describe: J, jejunum; I, ileum; AC, ascending colon; OVA, ovalbumin; BW, body weight. C) Venn Diagram derived from the integrative analysis. D) Fold change Heatmap for the thirteen variables that are common in the two comparisons. Red color indicates the gene expression upregulation or higher levels of the variable, while blue signifies downregulation or reduced levels, compared to CAF. * indicates p-value < 0.05, # indicates p-value < 0.1.

Interestingly, by integrating these two comparisons in a Venn diagram (Figure 6C), we obtained that nine variables were modified not only by the cafeteria diet, but also by the insect consumption in this diet-induced obesogenic situation. By observing these variables and their corresponding variation between groups, we were able to determine whether the consumption of an insect-based diet could exert a possible compensatory effect on the changes induced by the cafeteria diet (Figure 6D). In this sense, the levels of urea and plasma triglycerides were significantly altered

by the cafeteria diet but reversed by the insect-based diet consumption. The same was observed for IL-10 and IL-18, the latter tending to increase in the CAF group and statistically decreasing with insect consumption.

To further investigate the effect of an insect-based diet in obesogenic conditions, we also analysed the univariate difference on the main variables selected by two or three methods of machine learning algorithms. In this sense, kilocalorie intake was the main variable that differed between the CAF and control groups. As expected, it increased when the animals consumed the cafeteria compared to the control group, regardless of whether the animals consumed insect protein or not (Figure 7).

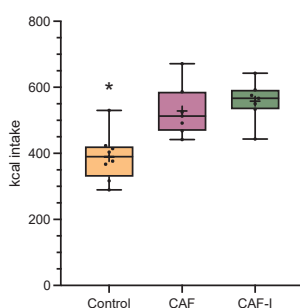


Figure 7. Kilocalories intake of control, CAF and CAF + I groups. The data are presented in a box and whiskers plot. Boxes represent the median and interquartile range, while whiskers extend from the smallest to the largest values, encapsulating the full range of the data (n=7/8) * indicates statistical difference with respect to CAF group, using Mann-Whitney U test ($p < 0.05$).

These could be explained by the increased consumption of fats in the cafeteria groups compared with the control group, to the detriment of fibre intake, while they consumed the same amount of carbohydrate and protein (Supplementary Figure 2). Furthermore, examination of individual food consumption within the cafeteria-fed groups showed that they obtained more kilocalories from milk than from feed, and more from feed than from bacon, carrots and sausages, with no differences between the CAF and CAF-I groups (Supplementary Figure 3).

At the biochemical level, TAGs plasmatic levels were significantly higher in cafeteria rats (Figure 8A). Plasma urea levels were significantly lower in insect-fed rats compared to the cafeteria group (Figure 8B), while urinary urea levels were lower in cafeteria rats compared to both control and CAF-I groups (Figure 8C). In addition, the urine/plasma urea ratio analysed was significantly lower in the CAF group compared to the control but also to CAF-I, indicating a return to the control state with

insect consumption (Figure 8D). Plasma levels of NEFA's, cholesterol and insulin did not change between groups (Supplementary Table 5).

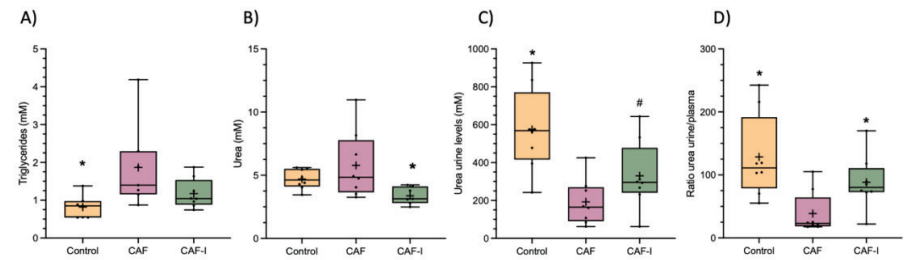


Figure 8. Biochemical variables selected in the integrative analysis The data are presented in a box and whiskers plot. Boxes represent the median and interquartile range, while whiskers extend from the smallest to the largest values, encapsulating the full range of the data (n=7/8). # indicates trend and * indicates statistical difference compared to CAF group using Mann-Whitney U test ($0.1 > p < 0.05$; and $p < 0.05$ respectively).

According to the immune response, IL-18 levels tended to increase in the cafeteria group compared to the control, whereas the CAF+I group significantly reduced plasmatic levels compared to the cafeteria and returned to homeostatic levels (Figure 9A). IL-10 was also increased by cafeteria consumption compared to control, with no effect of insect consumption (Figure 9B). On the other hand, although intestinal secretory IgA and plasmatic IgE levels were also selected by machine learning, no significant changes were observed (Figure 9C-D). Furthermore, TNF- α , IL-1 β , histamine and OVA plasmatic levels and ileal sIgA and IL-1 β gene expression did not differ between groups (Supplementary Table 6).

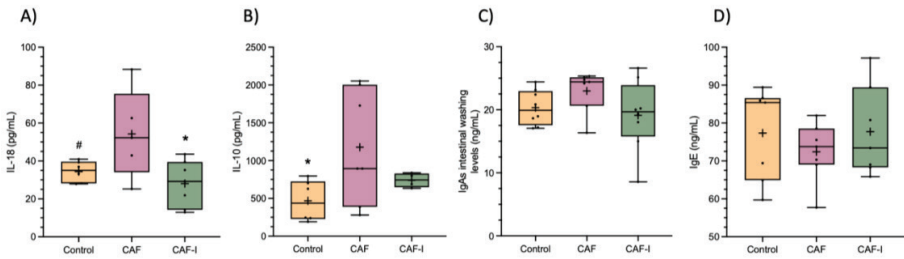


Figure 9. Inflammatory and permeability parameters selected in the integrative analysis. The data are presented in a box and whiskers plot. Boxes represent the median and interquartile range, while whiskers extend from the smallest to the largest values, encapsulating the full range of the data (n=7/8). # indicates trend and * indicates statistical difference compared to CAF group using Mann-Whitney U test ($0.1 > p < 0.05$; and $p < 0.05$ respectively).

As expected, some morphological variables were altered when rats consumed cafeteria diet. Statistical analysis showed that these rats showed an increase in percentage body weight gain, fat and brown adipose tissue, stomach and liver weights, and a trend towards increased kidney and small intestine weights. On the other hand, CAF+I group resulted in a more length of the small intestine when compared to CAF (Table 2). In contrast, spleen, caecum and colon weight and colon length did not differ between groups (Supplementary Table 7).

Table 2. Morphological parameters selected in the integrative analysis. Results are presented as the mean $\pm$ SEM (n=7/8). # indicates tendency and * indicates statistical difference observed when compared to CAF group using Mann-Whitney (0.1>p<0.05; and p < 0.05 respectively).

	Control	CAF	CAF - I
Body weight gain (%)	23.4 $\pm$ 2.91 *	51.0 $\pm$ 8.47	48.2 $\pm$ 4.77
Adipose tissue (%)	5.80 $\pm$ 0.39 *	8.80 $\pm$ 0.78	9.05 $\pm$ 0.61
Brown adipose tissue (g)	0.56 $\pm$ 0.05 *	0.91 $\pm$ 0.08	0.92 $\pm$ 0.06
Liver weight (g)	8.01 $\pm$ 0.46 *	10.0 $\pm$ 0.50	9.50 $\pm$ 0.44
Kidney weight (g)	0.80 $\pm$ 0.03 #	0.93 $\pm$ 0.04	0.98 $\pm$ 0.04
Stomach weight (g)	1.20 $\pm$ 0.02 *	1.33 $\pm$ 0.05	1.28 $\pm$ 0.02
Small intestine weight (g)	6.61 $\pm$ 0.25 #	7.53 $\pm$ 0.32	8.20 $\pm$ 0.40
Small intestine length (cm)	101 $\pm$ 1.86	98.9 $\pm$ 1.64	106 $\pm$ 2.07 *

Finally, several taste receptors were selected as important variables, especially in animals that consumed the insect-based diet in addition to the cafeteria diet. In particular, taste receptors gene expression in the jejunum and ascending colon appeared to be more sensitive to insect consumption in an obesogenic state. Ascending colon tas1r1 expression was selected by two comparisons, but only the cafeteria diet tended to downregulate its expression compared to the control (Figure 10A). Although colonic tas2r108 was also selected by two comparisons, it was not significantly changed by either cafeteria or insect consumption (Figure 10B). Furthermore, insect consumption reduced tas1r1 and tas1r3 jejunal expression in the pathological situation (Figure 10C-D). Jejunal, ileal and colonic tas2r expression did not show significant differences between groups in the pathological situation, although some of them were selected by machine learning algorithms (Supplementary Figure 4).

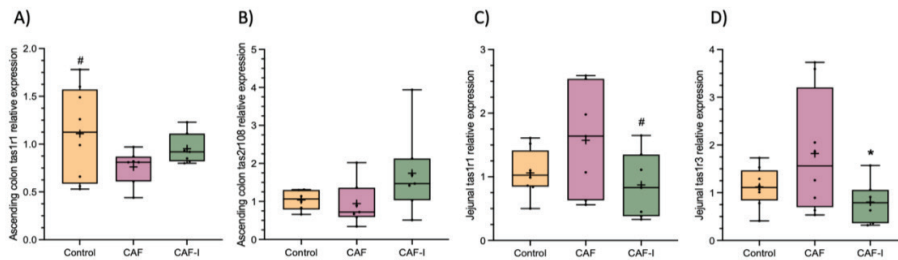


Figure 10. Taste receptor expression of genes selected in the integrative analysis. The data are presented in a box and whiskers plot. Boxes represent the median and interquartile range, while whiskers extend from the smallest to the largest values, encapsulating the full range of the data (n=7/8). # indicates trend and * indicates statistical difference compared to CAF group using Mann-Whitney U test ($0.1 > p > 0.05$; and $p < 0.05$ respectively).

Discussion

In a context where there is a need to find new sources of dietary protein as part of the great food transformation to support environmental sustainability while promoting human health, the impact of insect consumption on health is an emerging field of study ²⁰. In this sense, the present study reveals, for the first time, the overall effects of chronic consumption of an insect-based diet in female rats, compared to casein or beef-based diets under healthy condition and in the context of a cafeteria diet-induced pathological situation. By examining several physiological parameters, our results demonstrated the relationship between dietary composition and physiological responses. In particular, in the context of inflammation and metabolism, our study showed health benefits of insect consumption in both healthy and obese states. In addition, the safety of consuming insects as a unique source of protein, replacing more conventional protein sources (beef-based diet or casein-based diet), was demonstrated.

In the healthy situation, the animals' food intake did not change between groups, and no changes were observed in the tissue measurements or in the percentage of body weight gain. Similarly, a previous study in a healthy rat model in which meat was partially replaced with *Alphitobius diaperinus* reported no difference in food intake and body weight ³. Furthermore, our results in the obesogenic state showed that the consumption of insect along with the cafeteria diet did not change kilocalorie intake or the weights of different organs compared to the cafeteria group. These results seem to indicate that insect consumption is similar to other animal protein sources. Interestingly, the insect-based diet in obesogenic state resulted in an increase in small intestine length, in agreement

with a previous study in broilers fed *Tenebrio molitor* larvae ²⁰. They suggested that this could be a response to chitin content, hypothesising that it could affect the digestibility of protein. Feeding a poorly digestible diet could trigger compensatory mechanisms as the organism attempts to increase the surface area available for nutrient absorption ²¹. On the other hand, as expected and previously described ²², morphological assessments highlighted the detrimental effects of cafeteria diet on adiposity and organ weights, underscoring the pathological consequences of prolonged unhealthy dietary habits.

At the metabolic level, in terms of glucose, cholesterol and insulin levels, similar to what has been reported previously ⁷, we did not observe any changes between the insect group and the control group in the healthy state, reinforcing their healthier metabolic response. The consumption of the beef-based diet increased plasma triglyceride levels compared to the control diet, but they were not altered by the insect-based diet. A previous article also reported an increase in triglycerides and other markers of lipid metabolism when mice consumed beef instead of casein as a protein source ²³. Insects are known to be rich in fatty acids, and although the diets were prepared to achieve the same nutritional profile, the source of protein and fats was changed between the diets. Therefore, these findings highlight the importance of considering the source of protein in dietary interventions aimed at optimising metabolic health.

In the context of obesity, rats exhibited pronounced metabolic dysregulation, characterised by increased caloric intake and dyslipidaemia. The comparison of the healthy and pathological situations revealed distinctive patterns of food intake, with notable variations in macronutrient consumption. While carbohydrate and protein intake remained consistent across the control and cafeteria groups, rats fed a cafeteria diet exhibited reduced fibre intake coupled with increased fat consumption. They consumed more milk and feed, which are a good source of fats, than the other cafeteria food. This results in elevated plasmatic triglyceride levels, as well as a profile of increased NEFAs, glucose, urea, and insulin. Despite the triglycerides being statistically indistinguishable between cafeteria groups, they were selected as the principal variables of separation between these groups. We could observe a compensatory effect of cafeteria-induced changes when animals consumed an insect-based diet. Similarly, chronic supplementation of mice fed a high-fat diet with insect larvae resulted in a reduction in lipid accumulation in the liver and plasmatic levels, as well as a reduction in body weight gain and adipose tissue weight ²⁴. Furthermore, some authors have previously suggested that the consumption

of insects could reduce the intestinal absorption of lipids from the diet due to their bioactive peptides or chitin content ²⁵. In a separate study, ethanolic extracts from crickets demonstrated the ability to counteract the damage induced by a high-fat diet in rats, resulting in a reduction in abdominal and epididymal fat weight, cholesterol, and triglyceride levels ²⁶. Collectively, these findings suggest that the consumption of insects may lead to an improvement in the altered metabolic response.

Continuing with the changes at metabolic level, urinary urea was identified as a key variable for discriminating between groups in all comparisons. In light of this, we proceeded to also examine plasma urea levels and the urine-to-plasma ratio. In the healthy state, the beef group exhibited lower urinary urea levels and a lower urine/plasma urea ratio than the control group. Conversely, the plasmatic levels were higher in the beef group than in the insect group. Furthermore, in the pathological state, animals consuming a CAF diet alone also exhibited lower urinary urea levels and a lower urine/plasma urea ratio than the control group. However, the insect-based diet in this situation returned urea to control levels, decreasing levels in plasma and increasing levels in urine. Plasma urea levels vary depending on protein intake, the ability to catabolize protein and adequate renal excretion of urea ²⁷. Previous research, such as that by Syauqy et al, has shown that the consumption of processed food/sweets and meat-seafood-eggs diets are associated with higher plasma urea levels ²⁸, which are associated with a decline in kidney function ²⁹. In this sense, beef and cafeteria consumption may affect the renal function, but further determinations are needed. In contrast, considering that protein intake did not change between groups and that urinary urea levels were higher in the insect group, our results may indicate good renal function when insects are consumed and an ameliorative effect of insect consumption on renal function in an obesogenic situation. Another hypothesis is that amino acid metabolism and the urea cycle may be more efficient in an insect-based diet. As previously described by Hermans et al., both mealworm protein and milk-derived protein ingestion are followed by rapid protein digestion and amino acid absorption ⁷. However, in general, animal sources are known to have high protein digestibility ³⁰. Therefore, further studies on ileal amino acid absorption, metabolism and renal function after insect ingestion may be of interest in the near future.

From the integrative analysis perspective, immune and allergenic-related parameters, as well as taste receptor expression, emerged as key indicators distinguishing between a pure protein consumption and insect or beef groups. However, when we observed univariate analysis, only the

consumption of insect-based diet elicited significant reduction of TNF- α levels, suggesting a potential immunomodulatory effect. This is in the line of another study which reported that 14-days cricket consumption in healthy adults, reduced systemic inflammation by decreasing plasmatic TNF- α levels³¹.

In the diet-induced obesogenic condition, IL-18 and IL-10 were the only that changed between control and cafeteria groups. Similarly, recent study in mice reported changes in IL-18, but not in TNF- α , IL-1 β or IL-10 that resulted unaltered when animals consumed western diet³². Our study indicated an amelioration of this inflammatory with insect consumption attenuating cafeteria diet-induced IL-18 increase, as well as IL-10, intestinal secretory IgA and intestinal permeability profile which also appear to be returned to homeostatic levels. Considering that inflammation is an important element during the development of obesity or metabolic dysregulations induced by cafeteria diet³³, our results suggest a suppression by insect consumption of pro-inflammatory factors in this context. Insects are known to provide essential unsaturated fatty acids (ω -3 and ω -6), their protein hydrolysis could result in specific peptides, and they are a source of phytosterols that they obtain from dietary sources^{34,35}. These nutrients have been widely associated with anti-inflammatory properties³⁶. In addition, insects are a source of chitin, and by-products obtained through the action of microbiota could also exert immunomodulatory properties³⁷. Thus, there is some indication of an anti-inflammatory response when insects are consumed by animals in both healthy and pathological situations.

Following with the intestinal taste receptor expression, they have important functions in maintain general health³⁸. The role of these receptors when located in the apical side of enterocytes is to be activated by the taste components of the diet, particularly umami compounds stimulate tas1r1/tas1r3 heterodimer and bitter compounds stimulate different tas2r^{39,40}, and trigger metabolic and inflammatory responses. In particular, their activation has been described to be involved in the enteroendocrine secretion of hormones for satiety and metabolic response (ghrelin, GLP-1, CCK, etc)³⁹. Furthermore, they have been recently associated to inflammatory regulation^{41,42}. Their mRNA expression levels modulation by diet is not extensively studied, but some studies suggested a modulation by agonist or other food components⁴³.

In the current work, ileal expression of tas2r119 was lower when animals consumed beef or insect diets, compared with casein diet. Moreover, although no significative changes were observed,

tas1r1 expression in various locations (jejunum, ileum, and ascending colon) were selected as variable distinguishing healthy groups of rats. We previously observed upregulation of colonic tas1r1 when rats were supplemented by insects (results accepted to be published in Journal of Agricultural and Food Chemistry). Here, despite the absence of significant difference, if we observed the relative expression profile, jejunal and ileal expression of this gene was lower, and colonic expression seemed to be increased in the insect-based diet compared to the beef-based diet. As we previously described, the expression of these receptors is modulated by amino acid composition. Therefore, we could attribute the possible variation of the gene expression to the differentiate amino acid that reach each part of the colon.

Lanng et al. described that ingestion of insect protein was associated with a larger amount of aspartate, methionine, glutamate, branched-chain amino acids (BCAA) and the aromatic amino acids, tyrosine and phenylalanine, in the small intestine, compared with ingestion of pork protein ³. Dai et al. also described that protein intake resulted in a rise in plasma amino acid concentration; leucine, BCAA and essential amino acids (EAA) concentration was greater for cricket protein, while non-essential amino acids (NEAA) and total amino acids (TAA) concentration was greater for beef-derived protein ⁸. Collectively, different pattern of protein residues that reach the intestinal tract and may be absorbed could also affect in a different manner the intestinal response, and particularly, the expression of taste receptors susceptible to certain amino acids.

Moreover, the analysis of intestinal taste receptor expression in pathological condition revealed intriguing insights into the potential of insect-based diet in mitigating cafeteria diet-induced alterations. While cafeteria diet seemed to perturb the expression of umami taste receptors in the jejunum and ascending colon, insect consumption exerted a modulatory effect, particularly evident in the downregulation of jejunal tas1r expression. Although our results not showed significant changes when animals consumed cafeteria which respect to control, previous study with mice revealed an increase of tas1r3 expression after long-term consumption of Western diet and associated this receptor with intestinal inflammatory response ⁴⁴. In this context, our study demonstrated that insect-based diets mitigated the potential upregulation of this receptor in the jejunum. Consequently, insect consumption appears to exert a regulatory influence on the expression of taste receptors, which could potentially elicit a range of beneficial physiological responses that must be further investigated.

In conclusion, the present work provides some of the first evidence of the physiological effects of consuming an insect-based diet as a unique protein source compared to traditional protein sources under both healthy and obesogenic conditions. The effects studied in the healthy state, at the metabolic, inflammatory, morphological, and intestinal taste receptor expression levels, underline the potential of insect-based diets as a viable alternative for health promotion. In the context of an obesogenic environment, the consumption of insect-based diets appeared to mitigate some of the adverse effects induced by the cafeteria diet at the levels of inflammation, metabolism, and intestinal taste receptors. This indicates that insects could be a viable alternative protein source, even when used as the main protein contributor in the diet. Furthermore, possibly due to their rich content of bioactive compounds that may confer health advantages ⁴⁶, their potential benefits extend to pathological conditions such as obesity. Further research is needed to elucidate the underlying mechanisms and long-term effects of insect-based diets.

References:

1. Sosa, D. A. T. & Fogliano, V. Potential of Insect-Derived Ingredients for Food Applications. *Insect Physiology and Ecology* (2017) doi:10.5772/67318.
2. Ma, Z., Mondor, M., Goycoolea Valencia, F. & Hernández-Álvarez, A. J. Current state of insect proteins: extraction technologies, bioactive peptides and allergenicity of edible insect proteins. *Food Funct* 14, 8129–8156 (2023).
3. Lanng, S. K. et al. Partial substitution of meat with insect (*Alphitobius diaperinus*) in a carnivore diet changes the gut microbiome and metabolome of healthy rats. *Foods* 10, 1814 (2021).
4. Liceaga, A. M., Aguilar-Toalá, J. E., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F. & Hernández-Mendoza, A. Insects as an Alternative Protein Source. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-052720-112443> 13, 19–34 (2022).
5. Ros-Baró, M. et al. Edible Insect Consumption for Human and Planetary Health: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health* 19, 11653 (2022).
6. Cunha, N., Andrade, V., Ruivo, P. & Pinto, P. Effects of Insect Consumption on Human Health: A Systematic Review of Human Studies. *Nutrients* 15, (2023).
7. Hermans, W. J. H. et al. Insects are a viable protein source for human consumption: from insect protein digestion to postprandial muscle protein synthesis in vivo in humans: a double-blind randomized trial. *Am J Clin Nutr* 114, 934–944 (2021).
8. Dai, J., Lov, J., Martin-Arrowsmith, P. W., Gritsas, A. & Churchward-Venne, T. A. The acute effects of insect vs. beef-derived protein on postprandial plasma aminoacidemia, appetite hormones, appetite sensations, and energy intake in healthy young men. *Eur J Clin Nutr* 76, 1548–1556 (2022).
9. Gessner, D. K. et al. Insect Meal as Alternative Protein Source Exerts Pronounced Lipid-Lowering Effects in Hyperlipidemic Obese Zucker Rats. *J Nutr* 149, 566–577 (2019).
10. Segú, H. et al. Assessing the impact of insect protein sources on intestinal health and disease: insights from human ex vivo and rat in vivo models. *Food Funct* (2024) doi:10.1039/d4fo00381k.
11. Westhoek, H. et al. Food choices, health and environment: Effects of cutting Europe's meat and dairy intake. *Global Environmental Change* 26, 196–205 (2014).
12. Zhang, P. Influence of Foods and Nutrition on the Gut Microbiome and Implications for Intestinal Health. *Int J Mol Sci* 23, 23 (2022).
13. Lange, K. W. & Nakamura, Y. Edible insects and their potential anti-obesity effects: a review. *Food Science of Animal Products* 1, 9240008 (2023).
14. Konstantinidi, M. & Koutelidakis, A. E. Functional Foods and Bioactive Compounds: A Review of Its Possible Role on Weight Management and Obesity's Metabolic Consequences. *Medicines* 6, 94 (2019).
15. Aguilar-Toalá, J. E., Cruz-Monterrosa, R. G. & Liceaga, A. M. Beyond Human Nutrition of Edible Insects: Health Benefits and Safety Aspects. *Insects* 2022, Vol. 13, Page 1007 13, 1007 (2022).
16. Kang, Y. et al. Yellow Mealworm (*Tenebrio molitor*) and Lesser Mealworm (*Alphitobius diaperinus*) Proteins Slowed Weight Gain and Improved Metabolism of Diet-Induced Obesity Mice. *Journal of Nutrition* 153, 2237–2248 (2023).
17. Vdoviaková, K. et al. Surgical Anatomy of the Gastrointestinal Tract and Its Vasculature in the Laboratory Rat. *Gastroenterol Res Pract* 2016, (2016).

18. Gil-Cardoso, K. et al. The co-administration of proanthocyanidins and an obesogenic diet prevents the increase in intestinal permeability and metabolic endotoxemia derived to the diet. *J Nutr Biochem* 62, 35–42 (2018).
19. González-Quilen, C. et al. Grape-Seed Proanthocyanidins are Able to Reverse Intestinal Dysfunction and Metabolic Endotoxemia Induced by a Cafeteria Diet in Wistar Rats. *Nutrients* 11, (2019).
20. Willett, W. et al. Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *The Lancet* 393, 447–492 (2019).
21. Bovera, F. et al. Use of *Tenebrio molitor* larvae meal as protein source in broiler diet: Effect on growth performance, nutrient digestibility, and carcass and meat traits. *J Anim Sci* 94, 639–647 (2016).
22. Snel, J., Harmsen, H., van der Wielen, P. W. J. & Williams, B. A. Optimising Nutrient Digestion, Absorption and Gut Barrier Function in Monogastrics: Reality or Illusion? *Nutrition and Health of the Gastrointestinal Tract* (Wageningen Academic, 2002).
23. Gil-Cardoso, K. et al. Chronic supplementation with dietary proanthocyanidins protects from diet-induced intestinal alterations in obese rats. *Mol Nutr Food Res* 61, 1601039 (2017).
24. Ijaz, M. U. et al. Beef, Casein, and Soy Proteins Differentially Affect Lipid Metabolism, Triglycerides Accumulation and Gut Microbiota of High-Fat Diet-Fed C57BL/6J Mice. *Front Microbiol* 9, (2018).
25. Ahn, E. M., Myung, N. Y., Jung, H. A. & Kim, S. J. The ameliorative effect of *Protaetia brevitarsis* Larvae in HFD-induced obese mice. *Food Sci Biotechnol* 28, 1177 (2019).
26. Escobar-Ortiz, A. et al. Consumption of cricket (*Acheta domesticus*) flour decreases insulin resistance and fat accumulation in rats fed with high-fat and -fructose diet. *J Food Biochem* 46, e14269 (2022).
27. Ahn, M. Y., Kim, M. J., Kwon, R. H., Hwang, J. S. & Park, K. K. Gene expression profiling and inhibition of adipose tissue accumulation of *G. bimaculatus* extract in rats on high fat diet. *Lipids Health Dis* 14, 1–15 (2015).
28. Salazar, J. H. Overview of Urea and Creatinine. *Lab Med* 45, e19–e20 (2014).
29. Syaury, A., Hsu, C. Y., Lee, H. A., Rau, H. H. & Chao, J. C. J. Association between Dietary Patterns and Kidney Function Parameters in Adults with Metabolic Syndrome: A Cross-Sectional Study. *Nutrients* 13, 1–14 (2021).
30. Lin, J., Fung, T. T., Hu, F. B. & Curhan, G. C. Association of Dietary Patterns With Albuminuria and Kidney Function Decline in Older White Women: A Subgroup Analysis From the Nurses' Health Study. *Am J Kidney Dis* 57, 245 (2011).
31. Gilbert, J. A., Bendsen, N. T., Tremblay, A. & Astrup, A. Effect of proteins from different sources on body composition. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 21, B16–B31 (2011).
32. Stull, V. J. et al. Impact of Edible Cricket Consumption on Gut Microbiota in Healthy Adults, a Double-blind, Randomized Crossover Trial. *Sci Rep* 8, (2018).
33. Hohenester, S. et al. IL-18 But Not IL-1 Signaling Is Pivotal for the Initiation of Liver Injury in Murine Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 8602 21, 8602 (2020).
34. Gil-Cardoso, K. et al. A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats. *Br J Nutr* 117, 218–229 (2017).
35. Acosta-Estrada, B. A., Reyes, A., Rosell, C. M., Rodrigo, D. & Ibarra-Herrera, C. C. Benefits and Challenges in the Incorporation of Insects in Food Products. *Front Nutr* 8, 687712 (2021).

36. Zielińska, E., Baraniak, B. & Karaś, M. Identification of antioxidant and anti-inflammatory peptides obtained by simulated gastrointestinal digestion of three edible insects species (*Gryllobates sigillatus*, *Tenebrio molitor*, *Schistocerca gregaria*). *Int J Food Sci Technol* 53, 2542–2551 (2018).
37. Calder, P. C. Omega-3 Fatty Acids and Inflammatory Processes. *Nutrients* 2, 355 (2010).
38. Verbeke, K. A. et al. Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics. *Nutr Res Rev* 28, 42 (2015).
39. Behrens, M. & Lang, T. Extra-Oral Taste Receptors—Function, Disease, and Perspectives. *Front Nutr* 9, 881177 (2022).
40. Descamps-Solà, M. et al. Bitter taste receptors along the gastrointestinal tract: comparison between humans and rodents. *Front Nutr* 10, (2023).
41. Li, X. et al. Human receptors for sweet and umami taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 4692–4696 (2002).
42. Turner, A. et al. Interactions between taste receptors and the gastrointestinal microbiome in inflammatory bowel disease. *J Nutr Intermed Metab* 18, 100106 (2019).
43. Koh, G. Y., Rowling, M. J. & Pritchard, S. K. Possible role of type 1 and type 2 taste receptors on obesity-induced inflammation. *Nutr Rev* 80, 1919–1926 (2022).
44. Shahbandi, A. A., Choo, E. & Dando, R. Receptor Regulation in Taste: Can Diet Influence How We Perceive Foods? *J* 2018, Vol. 1, Pages 106–115 1, 106–115 (2018).
45. Shon, W. J. et al. Gut taste receptor type 1 member 3 is an intrinsic regulator of Western diet-induced intestinal inflammation. *BMC Med* 21, 1–22 (2023).
46. Rivas-Navia, D. M. et al. Bioactive compounds of insects for food use: Potentialities and risks. *J Agric Food Res* 14, 100807 (2023).

Supplementary Information

Supplementary Table 1. Nutritional composition of Control, Beef and Insect diets. SFAs are saturated fatty acids; MUFAs are monounsaturated fatty acids; PUFAs are polyunsaturated fatty acids; and Kcal/g are Kilocalories per gram.

	Control	Beef	Insect
Protein, % by weight	14.2	14.2	14.2
Carbohydrate, %by weight	63.8	64.6	62.7
Fat, %by weight	7.0	6.9	6.8
SFAs, % of fat	36.5	36.5	35.4
MUFAs, % of fat	32.0	32.2	32.2
PUFAs, % of fat	31.6	31.4	32.3
Kcal/g	3.7	15	15.4

Supplementary Table 2. Other biochemical parameters analysed in Control, Beef and Insect groups. Results are presented as the mean $\pm$ SEM (n=7/8).

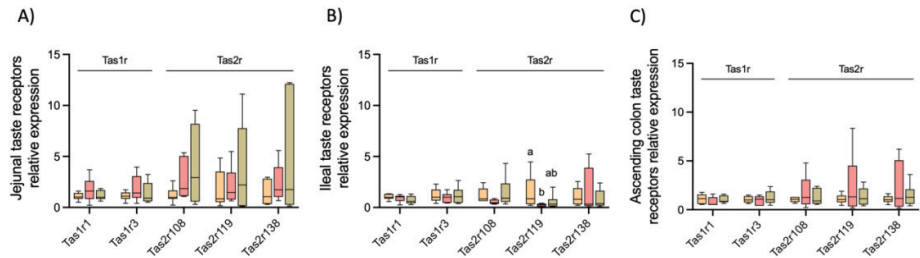
	Control	Beef	Insect
Glucose (mM)	7.18 $\pm$ 0.33	6.83 $\pm$ 0.20	6.96 $\pm$ 0.43
NEFAs (mM)	0.55 $\pm$ 0.04	0.59 $\pm$ 0.06	0.57 $\pm$ 0.06
Cholesterol (mM)	1.99 $\pm$ 0.13	1.96 $\pm$ 0.27	2.14 $\pm$ 0.10
Insulin (ng/mL)	2.59 $\pm$ 0.25	3.00 $\pm$ 0.34	2.16 $\pm$ 0.37

Supplementary Table 3. Other parameters related to plasmatic and intestinal inflammation, allergenicity, and intestinal permeability, analysed in Control, Beef and Insect groups. Results are presented as the mean $\pm$ SEM (n=7/8).

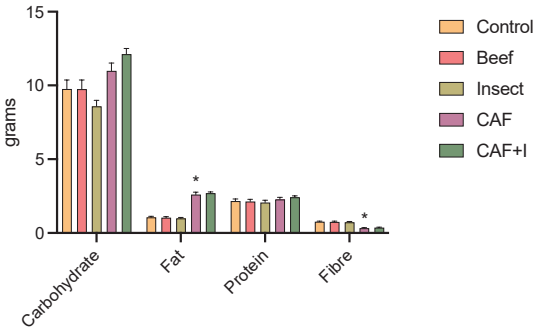
	Control	Beef	Insect
Plasmatic IL-1 β (pg/mL)	4.70 $\pm$ 1.43	6.04 $\pm$ 1.61	5.65 $\pm$ 0.95
Plasmatic Histamine (ng/mL)	11.9 $\pm$ 1.44	10.9 $\pm$ 0.83	10.7 $\pm$ 0.82
Plasmatic OVA (pg/mL) (intestinal permeability)	117 $\pm$ 15.8	104 $\pm$ 11.0	108 $\pm$ 17.4
Intestinal slgA (ng/mL)	20.3 $\pm$ 0.98	18.2 $\pm$ 2.03	20.7 $\pm$ 1.70
Ileal expression of slgA i.p.	1.04 $\pm$ 0.11	1.16 $\pm$ 0.14	1.41 $\pm$ 0.28
Ileal expression of IL-1 β	1.09 $\pm$ 0.19	1.75 $\pm$ 0.37	1.09 $\pm$ 0.23

Supplementary Table 4. Morphological parameters analysed in Control, Beef and Insect groups. Results are presented as the mean $\pm$ SEM (n=7/8).

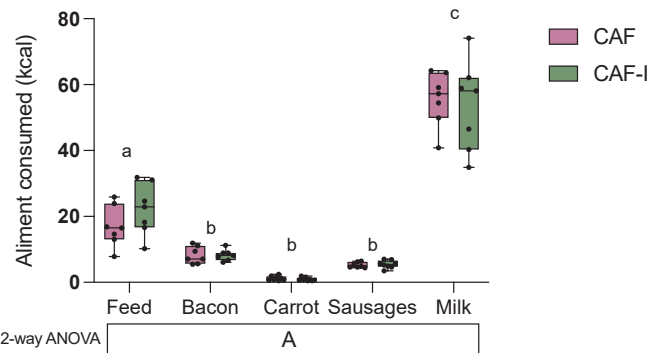
	Control	Beef	Insect
Body weight gain (%)	23.4 $\pm$ 2.91	26.7 $\pm$ 2.65	21.9 $\pm$ 3.31
Adipose tissue (%)	5.80 $\pm$ 0.39	5.91 $\pm$ 0.47	4.87 $\pm$ 0.24
Brown adipose tissue (g)	0.56 $\pm$ 0.05	0.66 $\pm$ 0.07	0.55 $\pm$ 0.03
Liver weight (g)	8.01 $\pm$ 0.46	8.61 $\pm$ 0.43	8.34 $\pm$ 0.51
Kidney weight (g)	0.80 $\pm$ 0.03	0.84 $\pm$ 0.02	0.84 $\pm$ 0.03
Stomach weight (g)	1.20 $\pm$ 0.02	1.26 $\pm$ 0.04	1.21 $\pm$ 0.04
Spleen weight (g)	0.70 $\pm$ 0.02	0.65 $\pm$ 0.03	0.74 $\pm$ 0.05
Full caecum weight (g)	2.28 $\pm$ 0.17	2.30 $\pm$ 0.07	2.37 $\pm$ 0.20
Clean caecum weight (g)	0.73 $\pm$ 0.05	0.71 $\pm$ 0.02	0.71 $\pm$ 0.03
Small intestine weight (g)	6.61 $\pm$ 0.25	7.05 $\pm$ 0.32	6.42 $\pm$ 0.22
Small intestine length (cm)	101 $\pm$ 1.86	102 $\pm$ 1.18	101 $\pm$ 2.20
Colon weight (g)	1.10 $\pm$ 0.05	1.12 $\pm$ 0.05	1.10 $\pm$ 0.11
Colon length (cm)	16.1 $\pm$ 0.48	15.6 $\pm$ 0.40	16.3 $\pm$ 0.95



Supplementary Figure 1. Taste receptor expression at jejunum (A), ileum (B) and ascending colon (C) of healthy animals. The data are presented in a box and whiskers plot. Boxes represent the median and interquartile range, while whiskers extend from the smallest to the largest values, encapsulating the full range of the data (n=7/8). Different letters indicate differences using Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$).



Supplementary Figure 2. Carbohydrate, Fat, Protein, and Fibre intake of each group. Results are presented as the mean $\pm$ SEM (n=7/8).



Supplementary Figure 3. Kilocalories obtained of each aliment consumed in cafeteria groups. Results are presented as the mean $\pm$ SEM (n=7/8). CAF indicates cafeteria; CAF-I indicates cafeteria + insect-based diet group. A indicates significant differences among foods using two-way ANOVA, and letters indicate differences using Bonferroni's multiple comparison test ($p < 0.05$). No differences between CAF and CAF-I groups.

Supplementary Table 5. Other biochemical parameters analysed in Control, CAF and CAF-I groups. Results are presented as the mean $\pm$ SEM (n=7/8). * indicates statistical difference observed when compared to CAF group using Mann-Whitney ($p < 0.05$).

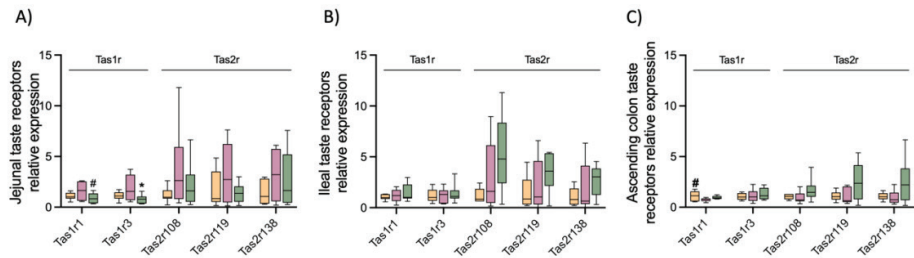
	Control	CAF	CAF - I
Cholesterol (mM)	1.95 $\pm$ 0.32	2.44 $\pm$ 0.32	2.65 $\pm$ 0.19
Glucose (mM)	7.18 $\pm$ 0.33	7.78 $\pm$ 0.26	7.45 $\pm$ 0.12
NEFAs (mM)	0.55 $\pm$ 0.04	0.67 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.07
Insulin (ng/ml)	2.42 $\pm$ 0.63	3.99 $\pm$ 0.56	3.80 $\pm$ 0.72

Supplementary Table 6. Other parameters related to plasmatic and intestinal inflammation, allergenicity, and intestinal permeability, analysed in Control, CAF and CAF-I groups. Results are presented as the mean $\pm$ SEM (n=7/8).

	Control	CAF	CAF - I
Plasmatic TNF-a (pg/mL)	137 $\pm$ 30.1	191 $\pm$ 69.5	149 $\pm$ 54.3
Plasmatic IL-1 β (pg/mL)	4.70 $\pm$ 1.43	13.3 $\pm$ 4.12	15.9 $\pm$ 4.88
Plasmatic Histamine (ng/mL)	11.9 $\pm$ 1.44	11.0 $\pm$ 0.93	11.6 $\pm$ 1.16
Ileal expression of sIgA i.p.	1.04 $\pm$ 0.11	1.77 $\pm$ 0.39	2.13 $\pm$ 0.54
Ileal expression of IL-1 β	1.09 $\pm$ 0.19	1.51 $\pm$ 0.42	1.42 $\pm$ 0.31
OVA plasmatic levels (pg/mL) (intestinal permeability)	117 $\pm$ 15.8	135 $\pm$ 15.8	131 $\pm$ 15.4

Supplementary Table 7. Morphological parameters analysed in Control, CAF and CAF-I groups. Results are presented as the mean $\pm$ SEM (n=7/8). # indicates tendency and * indicates statistical difference observed when compared to CAF group using Mann-Whitney (0.1>p<0.05; and p < 0.05 respectively).

	Control	CAF	CAF - I
Spleen weight (g)	0.70 $\pm$ 0.02	0.71 $\pm$ 0.02	0.74 $\pm$ 0.04
Full caecum weight (g)	2.28 $\pm$ 0.17	2.07 $\pm$ 0.15	2.16 $\pm$ 0.09
Clean caecum weight (g)	0.73 $\pm$ 0.05	0.71 $\pm$ 0.06	0.77 $\pm$ 0.05
Colon weight (g)	1.10 $\pm$ 0.05	1.04 $\pm$ 0.05	1.07 $\pm$ 0.06
Colon length (cm)	16.1 $\pm$ 0.48	15.9 $\pm$ 0.43	15.8 $\pm$ 0.67



Supplementary Figure 4. Taste receptor expression at jejunum (A), ileum (B) and ascending colon (C) of CAF animals. The data are presented in a box and whiskers plot. Boxes represent the median and interquartile range, while whiskers extend from the smallest to the largest values, encapsulating the full range of the data (n=7/8). # indicates tendency and * indicates statistical difference observed when compared to CAF group using Mann-Whitney (0.1>p<0.05; and p < 0.05 respectively).

Discussió general

L'exploració del consum d'insectes com a font proteica sostenible ha rebut una atenció considerable. En aquest context, aquesta tesi tenia com a objectiu analitzar l'impacte del consum d'insectes en la salut intestinal i, posteriorment, en les respostes immunitàries i metabòliques locals i sistèmiques, examinant escenaris d'inflamació tant sans com induïts. A més, hem explorat la potencial modulació dels receptors del gust intestinal per insectes i les seves possibles implicacions per a la salut. Per fer-ho, s'han dut a terme tres estudis per identificar els efectes de dues espècies d'insectes diferents: el cuc de la farina (*Tenebrio molitor*) i l'escarabat negre del jaç de les aus (*Alphitobius diaperinus*). Tots dos pertanyen a la família dels tenebrionids de l'ordre dels coleòpters i comparteixen composicions nutricionals similars en l'estadi larvari.¹ Mentre que *T. molitor* és un insecte àmpliament utilitzat en diversos sectors i considerat prometedor en les indústries d'aliments i pinsos,² *A. diaperinus* ha estat menys emprat, per la qual cosa requereix més estudis sobre els seus efectes sobre la salut.³ Per omplir aquest buit, vam avaluar els efectes tant de *T. molitor* com d'*A. diaperinus*, per determinar també si els efectes eren específics de cada espècie. Tots dos insectes van rebre una opinió positiva de l'EFSA per ser acceptats com a nous aliments per al consum humà, però, com s'ha esmentat abans, encara calen més estudis sobre els efectes del seu consum en la salut.⁴

⁵ A més, també vam comparar aquests efectes amb els d'altres fonts proteiques convencionals, com ara proteïna animal d'alta qualitat (vedella), proteïna vegetal rica en fibra (ametlla) i caseïna (vaca).

En primer lloc, hem analitzat en humans la resposta immunitària intestinal a l'exposició a insectes en comparació amb altres fonts de proteïnes ingerides amb més freqüència en la dieta humana. Per això, vam avaluar els efectes ex vivo de tres fonts proteiques diferents —carn de boví, ametlla i *A. diaperinus*— sobre la resposta immunitària intestinal humana en mostres de còlon. Els nostres resultats van mostrar que l'exposició a extractes d'insectes va resultar en una menor secreció de citocines infla-

matòries i immunoglobulines al·lèrgiques en comparació amb els extractes d'ametlla o vedella (**manuscrit 1**). Malgrat que s'ha suggerit que un consum elevat de carn vermella pot alterar la microbiota intestinal, deteriorar la integritat de la barrera i induir la producció de citocines inflamatòries,⁶ la resposta a l'ametlla semblava contrarestada per un efecte antiinflamatori, que també s'ha descrit que té un efecte protector contra el desenvolupament d'inflamació gastrointestinal.⁷ Pel que fa a l'efecte d'*A. diaperinus*, els nostres resultats van mostrar que no afectava la inflamació intestinal, i suggerien un perfil inflamatori més saludable per a les farines derivades d'insectes en comparació amb altres extractes. En aquest sentit, estudis previs han destacat les propietats antiinflamatòries dels compostos bioactius dels insectes.⁸ No obstant això, per avaluar completament aquests efectes, calen més investigacions que examinin diferents concentracions d'extractes d'insectes, analitzin biomarcadors addicionals i utilitzin una varietat de models experimentals.

Tenint en compte això, vam dur a terme un experiment en què les rates Wistar es van suplementar amb cròniques dosis baixes de les dues espècies d'insectes. Després de constatar l'absència d'efectes adversos per a la salut en els animals, es va fer un altre estudi utilitzant el consum crònic d'insectes (*A. diaperinus*) com a única font de proteïna en la dieta, la qual cosa significava que la ingesta d'insectes era aproximadament 30 vegades més gran que en l'estudi de suplementació, i es va comparar amb la mateixa quantitat d'altres fonts proteiques. A més, tots dos estudis van incloure dos models: estat saludable i d'inflamació induïda, ja sigui per injecció intraperitoneal de LPS o per ingestió de dieta de cafeteria (dieta CAF).

Com s'ha demostrat anteriorment, la injecció intraperitoneal d'LPS en rates de laboratori es descriu per modelar una disfunció intestinal aguda, que augmenta la permeabilitat i causa un estat proinflamatori a l'intestí i sistèmicament.⁹ A més, la dieta de cafeteria per a rates, equivalent a la dieta occidental en humans, es caracteritza per ser rica en carbohidrats refinats, sucres simples i àcids grassos saturats i baixa en fibra. Aquesta dieta en rates imita el desenvolupament de la síndrome metabòlica en humans, des de l'inici promovent la hiperfàgia fins al desenvolupament de tots els símptomes metabòlics.^{10, 11} Igual que el model LPS, encara que per vies diferents, la dieta de cafeteria s'ha relacionat amb la inducció de disfunció intestinal, inflamació de baix grau i endotoxèmia metabòlica.¹² En aquest sentit, en el primer estudi vam avaluar l'efecte preventiu de la suplementació d'insectes a dosis baixes en un model LPS, i en el segon estudi ens va permetre analitzar el consum d'insectes com a font proteica única en condicions obesogèniques. Això ens va permetre investigar la bioactivitat potencial del consum d'insectes en aquestes condicions i proporcionar informació valuosa sobre els seus efectes en la salut intestinal i la inflamació.

Començant per l'intestí, per la seva importància com a principal barrera entre els aliments externs i els patògens i l'organisme, la morfologia del duodè al colòn es va conservar principalment amb suplementes d'insectes. Cal destacar que es va observar una ràtio més elevada de vellositat/crípta en el jejú. En canvi, la injecció d'LPS, com han descrit anteriorment altres autors,^{13,14} va disminuir la relació vellositat/crípta ileal. No obstant això, aquest efecte va ser mitigat per la suplementació d'insectes (**manuscrit 1**). L'estructura de les criptes i vellositats és un element molt important de l'epiteli intestinal, que indica la proliferació i absorció de les cèl·lules intestinals i contribueix a la seva homeòstasi.¹⁵ Mentre que un augment de la relació vellositat/crípta s'associa amb una millora de les funcions digestives i absortives intestinals i és un indicador de salut intestinal, maduresa i capacitat d'enteròcits, un mal desenvolupament intestinal pot estar associat a diverses malalties i una reducció de l'absorció de nutrients.^{16, 17} D'acord amb això, calculem la superfície d'absorció. Malgrat que en l'anàlisi univariant no hi va haver diferències estadístiques en aquesta mesura com a resultat del consum d'insectes, els resultats de l'anàlisi integradora presentada al **manuscrit 2** van situar aquesta determinació com una variable clau per distingir entre els grups suplementats amb insectes i els no suplementats amb insectes. En concret, es va seleccionar la superfície d'absorció dels tres segments de l'intestí prim, que posicionava aquesta variable com la més afectada pels grups suplementats amb insectes, similar al que ha descrit recentment Vasilopoulos *et al.* De la mateixa manera, com es mostra al **manuscrit 3**, es va observar un augment de la longitud de l'intestí quan els animals consumien dietes basades en insectes en estat inflamatori, que indicava també una expansió de la superfície d'absorció. Estudis recents han demostrat efectes similars als nostres quan porcs o gallines consumeixen larves d'insectes.^{15,16} Certs components presents en els insectes, com els pèptids bioactius i aminoàcids específics, poden estimular la secreció de factors de creixement intestinal i contribuir a millorar la morfologia intestinal.¹⁷ A més, aquest efecte podria explicar-se pel contingut de quitina i els seus derivats en insectes, que s'ha postulat per augmentar també la superfície d'absorció.^{13, 18, 19} En conjunt, aquests estudis suggereixen que el consum d'insectes contribueix al desenvolupament intestinal, la salut i la funcionalitat.

Continuant amb els efectes de la ingesta d'insectes en el sistema intestinal, ni la baixa dosi de suplementació d'insectes ni la dieta basada en insectes van interrompre la barrera immunitària sobre la resposta immunitària de la mucosa en condicions sanes o en inflamació induïda. Això es va observar per primera vegada mesurant la IgA secretora (sIgA) en líquids de rentada intestinal. La sIgA juga un paper crucial com a primera línia de defensa en superfícies mucoses contra microorganismes i toxines infeccioses. Per tant, la seva presència i activitat són crítiques per mantenir la integritat de la barrera mucosa i evitar l'entrada d'agents nocius al torrent sanguini.²⁰ Aquesta im-

munoglobulina no es va veure alterada quan les rates consumien farina d'insecte com a suplement o com a única font de proteïnes en estat saludable. Per contra, encara que no són estadísticament significatius, els nivells de sIgA intestinal o expressió gènica, que semblaven augmentar en ambdós models inflamatoris en comparació amb l'estat saludable, també van ser seleccionats per anàlisi integrativa per diferir entre grups amb suplementació d'insectes i sense (**manuscrit 2**). Aquí, les rates que consumien insectes semblaven tenir nivells més baixos que les rates inflamades (**manuscrits 1 i 3**). A més, vam avaluar els canvis en la permeabilitat intestinal mesurant els nivells plasmàtics d'ovoalbúmina (OVA), que deriva del test OVA realitzat.²¹ Només va augmentar en animals tractats amb LPS, i això confirma l'efecte esperat de l'LPS i indica que el consum d'insectes no va afectar la permeabilitat intestinal de les rates (**manuscrit 1**). En canvi, tot i que la dieta CAF és un bon model per a la interrupció intestinal i l'augment de la permeabilitat, aquí no vam trobar canvis significatius després de 12 setmanes de dieta CAF. Sospitàvem que una durada més llarga d'aquesta dieta podria resultar en un major augment de la permeabilitat, com suggerien els nostres estudis anteriors, on aquest efecte era més pronunciat a partir de les 17 setmanes.²¹ No obstant això, malgrat les limitacions anteriors, es pot concloure que el consum d'insectes no va afectar significativament la permeabilitat intestinal en aquest context. En general, aquestes troballes suggereixen que el consum d'insectes no compromet la integritat intestinal ni la funció immune, i donen suport al seu potencial com a font de proteïnes sostenible amb efectes beneficiosos sobre la salut intestinal.

Totes les troballes anteriors són consistents amb la comprensió més àmplia de com les eleccions dietètiques afecten la funció intestinal. En termes de detecció de nutrients, el tracte gastrointestinal pot detectar sabors umami, dolços i amargs de la mateixa manera que la llengua a través dels receptors gustatius GCPR.²²⁻²⁴ Coneguts pel seu paper en la percepció sensorial, els receptors del gust també juguen un paper important en la regulació de la funció intestinal.²⁵ Com s'ha observat anteriorment, l'umami i diversos receptors del gust amarg podrien ser modulats per components dietètics.²⁶⁻²⁸ Per tant, saber si el consum d'insectes modula aquests receptors gustatius és crucial per entendre'n l'impacte potencial en la salut intestinal i el benestar general. En aquest sentit, la tesi actual també analitza els efectes de la ingestió d'insectes sobre l'expressió dels receptors intestinals del gust i la seva implicació en la salut intestinal i general. Pel que fa a l'expressió gènica relativa d'aquests receptors, identifiquem Tas1r1 del còlon, juntament amb Tas1r3 i alguns receptors del gust amarg que abasten des del jejú fins al còlon, com a receptors susceptibles de modulació per suplementació d'insectes a dosis baixes (**manuscrit 2**). En particular, l'expressió de Tas1r1 i Tas1r3, que formen l'heterodímer del receptor per al gust umami, principalment L-aminoàcids i pèptids, es va incrementar significativament en el còlon ascendent quan els animals es van suplementar

amb insectes. En aquest sentit, nombrosos estudis han demostrat que l'exposició crònica a certs compostos dietètics, inclosos els agonistes dels receptors del gust, pot conduir a canvis en l'expressió de l'ARNm d'aquests receptors.²⁹⁻³¹ D'altra banda, s'ha demostrat que el consum dietètic de glutamat i els aminoàcids de cadena ramificada (BCAA), isoleucina, leucina i valina, regulen l'expressió dels receptors umami jejunal.^{32,33} Sabent que els cucs de la farina són una bona font de glutamat i aspartat, i que també contenen BCAA, la modulació podria ser a través dels aminoàcids diferenciadors que arriben al còlon quan els animals es complementen amb insectes. No obstant això, quan el consum crònic d'insectes va ser unes 30 vegades superior al del primer estudi i la font única de proteïna (**manuscrit 3**), els umamis no van canviar significativament, com s'havia observat anteriorment. Tot i això, observant el perfil d'expressió relativa, l'expressió jejunal i ileal del gen *Tas1r1* va ser menor, mentre que l'expressió de còlon va augmentar en la dieta basada en insectes en comparació amb la dieta basada en carn de boví. Estudis previs han demostrat que s'absorbeixen diferents tipus d'aminoàcids en comparació amb la ingestió d'insectes-proteïnes amb altres proteïnes d'origen animal.^{34,35} En aquest sentit, es torna a suggerir que algunes variacions en l'expressió dels receptors del gust podrien explicar-se per diferents patrons de residus proteics que arriben i s'absorbeixen en cada secció de l'intestí. A més, també s'ha demostrat que la microbiota intestinal i els productes SCFA resultants de la seva activitat modulen l'expressió dels receptors del gust,³⁶ la qual cosa suggereix un mecanisme multifacètic que implica la composició no només d'aminoàcids, sinó també de metabòlits derivats de microbians en la modulació del receptor del gust del còlon.

D'altra banda, com que alguns dels receptors amargs, incloent-hi *Tas2r108*, *Tas2r119*, *Tas2r138*, *Tas2r139* i *Tas2r143*, també s'ha demostrat que són sensibles a certs pèptids i aminoàcids,³⁷⁻⁴¹ sospitàvem que la seva expressió també podria ser modulada pel consum d'insectes. En aquest sentit, el grup suplementat amb *A. diaperinus* va mostrar nivells d'expressió significativament més baixos de *Tas2r119* i *Tas2r138* del còlon (**manuscrit 2**), i reforça la idea que hi ha una modulació específica dels receptors gustatius en el còlon que poden estar influenciats per la microbiota.^{42,43} Per contra, el *Tas2r119* jejunal també va sorgir com una variable clau que va facilitar la diferenciació entre els grups suplementats amb insectes i el grup control. Encara que aquests receptors van perdre importància en distingir els grups quan els animals consumien insectes com a única font de proteïna, n'hi va haver, com el *Tas2r119* ileal, que van canviar els seus nivells d'expressió entre els grups d'animals sans (**manuscrit 3**). Això sembla indicar que *Tas2r119* és el receptor del sabor amarg que és més susceptible a la modulació per consum d'insectes.

Els receptors del gust, entre diferents funcions fisiològiques, han estat implicats en la resposta inflamatòria.^{44,45} A més, en patologies associades a una inflamació de

baix grau, com l'obesitat, l'evidència suggereix que la percepció del gust està alterada i que els receptors del gust estan implicats en la regulació de l'estat inflamatori.⁴⁶ Així, en el context de la inflamació, els receptors del gust poden veure's afectats i alhora contribuir potencialment a la resposta immunitària, de manera que creen un bucle de retroalimentació.⁴⁷ En aquest sentit, en el **manuscrit 1** hi observem que l'expressió intestinal dels receptors del gust, de nou especialment Tas1r1, Tas1r3 i Tas2r119, ha estat alterada per la injecció d'LPS, que ajuden a establir una connexió entre els receptors del gust i les alteracions immunitàries, com s'ha descrit anteriorment tant per a Tas1r com per a Tas2r.^{48,49} No obstant això, en aquesta condició, el consum d'insectes no va afectar l'expressió dels receptors del gust, possiblement a causa d'una dosi massa baixa d'insectes. Per contra, en la condició obesogènica, només observem una tendència a reduir l'expressió de Tas1r1 colònica en rates CAF, i el consum de dieta basada en insectes semblava contrarestar aquesta reducció (**manuscrit 3**). Com en la situació saludable, els receptors gustatius umami jejunal estaven desregulats amb el consum d'insectes en aquesta situació obesogènica, i sempre semblaven modular la seva expressió en la mateixa direcció que els controls saludables, la qual cosa contrarestavat els efectes de cafeteria.

Totes aquestes evidències donen suport a la idea que l'expressió dels receptors del gust intestinal és altament sensible als canvis en els patrons dietètics i l'estat de salut. En concret, hem demostrat que el consum d'insectes modula l'expressió de diversos receptors intestinals del gust. El següent pas era, per tant, conèixer les possibles conseqüències d'aquesta modulació sobre les funcions fisiològiques, ja que els receptors del gust s'han relacionat amb altres importants.²³ Per exemple, s'ha descrit que l'activació dels gustos amargs està implicada en la secreció enteroendocrina d'hormones per a la sacietat i la resposta metabòlica (grelina, GLP-1, CCK, etc.).⁵⁰ Curiosament, alguns autors també han demostrat que la secreció intestinal de l'hormona de sacietat CCK es pot produir a través de l'activació de Tas1r1/Tas1r3, mentre que altres també han suggerit la secreció de GLP-1 després de l'activació d'aminoàcids d'aquest receptor.³³ ⁵¹ En línia amb això, prèviament vam observar un augment en els nivells plasmàtics de GLP-1 després de la suplementació amb insectes,¹ i l'anàlisi integrativa realitzada en el **manuscrit 2** va revelar que GLP-1 és una altra variable clau per distingir els grups d'animals suplementats amb insectes i control. En conjunt, els nostres resultats proporcionen més evidència d'una possible relació entre els receptors umami (Tas1r1/Tas1r3), tots dos modulats per la ingestió d'insectes, i la secreció hormonal a l'intestí. A més, els receptors del gust extraorals s'han associat recentment amb la regulació inflamatòria, la motilitat del còlon i la funció metabòlica,^{46, 48, 52} però calen més estudis sobre el possible paper a l'intestí i més enllà. En aquest sentit, el nostre estudi de correlacions va revelar que el Tas1r1 del còlon, regulat per la ingestió d'insectes, mostrava

una correlació negativa amb les cèl·lules caliciformes. Malgrat que estudis previs han demostrat que aquestes cèl·lules expressen receptors de gust amarg a la seva membrana,⁵³ de moment els tipus Tas1r només s'han descrit en cèl·lules enteroendocrines i en plomall del còlon.^{54, 55} En aquest sentit, una possible explicació és que l'activació dels receptors Tas1r1 pot desencadenar cascades de senyalització aigües avall que modulen el desenvolupament cel·lular de caliciformes. A més, es van trobar correlacions positives entre els receptors del gust amarg ileal i umami i les expressions d'IgA secretora ileal, i això emfatitzava el paper dels receptors del gust en la resposta immunitària intestinal.⁴⁸ Finalment, el jejunal Tas2r119, l'amarg més modulats pel consum d'insectes i LPS, va indicar una correlació negativa amb la permeabilitat intestinal, de manera similar a la descrita anteriorment en un estudi *in vitro*.⁵⁶ Aquestes troballes estableixen col·lectivament les bases per a futures investigacions per explorar la implicació específica dels receptors del gust en la funció intestinal, específicament la integritat de la barrera i la resposta immunitària, tant en condicions saludables com patològiques.

D'altra banda, tenint en compte tot l'anterior, i donada l'estreta relació entre la salut intestinal i la seva potencial influència en el benestar general, possiblement mitjançant la modulació dels receptors del gust, també ens vam centrar a investigar paràmetres sistèmics per estudiar l'impacte del consum d'insectes en la salut general. En aquest sentit, també vam fer un cribratge de paràmetres sistèmics. En primer lloc, com que la preocupació actual sobre el consum d'insectes són les possibles reaccions al·lèrgiques, hem volgut avaluar la resposta al·lèrgica. En condicions saludables, no vam observar cap resposta al·lèrgica després del consum d'insectes. Més interessant, però, va ser l'estudi en el context d'una disfunció intestinal, com en animals tractats amb LPS o obesos, ja que diversos estudis han reportat que l'augment de la permeabilitat de l'epiteli intestinal pot facilitar l'entrada de potencials al·lèrgens alimentaris, que augmenten la sensibilització i el risc d'al·lèrgia.^{57, 58} Els nostres resultats proporcionen la primera descripció de l'evidència d'un efecte no al·lèrgic de la suplementació d'insectes a dosis baixes (**manuscrit 1**) i de la dieta basada en insectes (**manuscrit 3**), en models animals de permeabilitat deteriorada i inflamació intestinal (**manuscrit 1**). La resposta al·lèrgica requereix una presensibilització inicial seguida d'una interacció posterior amb l'al·lèrgic per desencadenar la resposta al·lèrgica.⁵⁹ En aquest sentit, la nostra suplementació crònica i contínua d'insectes en ambdós estudis ho té en compte.

Continuant en l'àmbit immunitari, mentre que el nostre primer estudi no va mostrar canvis significatius en els nivells de citocines inflammatòries sistèmiques quan els animals van ser suplementats amb una dosi baixa d'insectes, ja sigui en rates sànes o tractades amb LPS (**manuscrit 1**), el nostre segon enfocament va mostrar que el consum de la dieta basada en insectes afectava la resposta immunitària sistèmica

(**manuscrit 3**). En condicions saludables, el consum de la dieta basada en insectes va induir una reducció significativa en els nivells plasmàtics de TNF- α , la qual cosa suggereix un potencial efecte antiinflamatori sistèmic en rates. Això va ser consistent amb les troballes en humans sans, on es va informar que 14 dies de consum de grills també reduïen la inflamació sistèmica, ja que disminuïen els nivells plasmàtics de TNF- α .⁶⁰ De la mateixa manera, en la situació obesogènica en què s'indueix un estat inflamatori de baix grau,¹⁰ el consum d'insectes va atenuar l'augment induït per la dieta de cafeteria d'IL-18 i IL-10, que van tornar als nivells homeostàtics, i això suggereix potencials propietats antiinflamatòries associades amb dietes basades en insectes. El contingut dels insectes en àcids grassos insaturats essencials (α -3 i α -6), fitosterols i polifenols, que poden obtenir de la seva dieta, juntament amb els pèptids específics derivats de la seva proteïna, podria explicar aquests efectes immunoprotectors.^{61,62} A més, l'acció de la microbiota pel seu contingut en quitina també podria exercir propietats immuno-moduladores.⁶³ Així, els nostres estudis van indicar una resposta antiinflamatòria quan els insectes es consumeixen de manera crònica i en dosis elevades com a part de la dieta en situacions tant saludables com patològiques.

Com s'ha esmentat abans, l'impacte del consum d'insectes en la resposta immunitària també podria estar mediat pels receptors intestinals del gust. En aquest sentit, algunes publicacions han suggerit alteracions dels receptors gustatius en situacions de pertorbació immunitària,⁶⁴ així com la seva participació en el manteniment de l'equilibri immunitari.⁶⁵ Així, la nostra anàlisi de correlació en la situació d'LPS va mostrar connexió negativa entre els nivells plasmàtics de TNF- α , IL-1b i IL-10 i els receptors del gust amarg (especialment Tas2r119) en el jejú, així com una correlació positiva amb els receptors gustatius umami (especialment la subunitat Tas1r1) en el còlon proximal (**manuscrit 2**). Els resultats de la injecció d'LPS van mostrar una desregulació dels receptors de sabor amarg jejunal, acompanyada d'una pronunciada sobreexpressió de Tas1r1 de còlon, que semblava ser atenuada pel consum d'insectes en aquesta condició patològica. Això pot suggerir que l'efecte dels insectes sobre la regulació immunitària és paral·lel a la modulació dels receptors del gust amarg i umami a l'intestí. No obstant això, cal aprofundir en la mecànica i l'impacte d'aquests receptors en les funcions sistèmiques del cos.

Finalment, pel que fa a les respostes metabòliques, els nostres resultats van mostrar que la ingestió d'insectes no va tenir cap efecte significatiu sobre els paràmetres metabòlics en condicions saludables, de manera similar al que s'ha informat anteriorment,⁶⁶ ja sigui amb suplementos d'insectes (**manuscrit 1**) o quan tota la proteïna de la dieta provenia d'insectes (**manuscrit 3**). No obstant això, en aquesta segona intervenció dietètica, el metabolisme del nitrogen va ser diferent del grup que consumia vedella. Pel que fa a la situació patològica, el tractament amb LPS provoca una desregulació

metabòlica, mentre que el consum de *T. molitor* va evitar significativament els canvis induïts per LPS en la glucèmia i la urèmia (**manuscrit 1**). De la mateixa manera, les rates en estat obesogènic induït per la dieta de cafeteria van presentar una pronunciada desregulació metabòlica caracteritzada principalment per un augment de la ingesta calòrica, dislipèmia i trastorns urèmics (**manuscrit 3**). De nou, el consum d'insectes semblava alleujar els trastorns de la dislipèmia i la urèmia en aquesta condició obesogènica. Els nivells d'urea plasmàtica varien depenent de la ingesta de proteïnes, la capacitat de catabolitzar proteïnes i l'excreció renal adequada de la urea.⁶⁷ En aquest sentit, la ràpida digestió de proteïnes i l'absorció d'aminoàcids després de la ingestió d'insectes, tal com s'ha descrit en estudis anteriors,⁶⁶ poden contribuir a un metabolisme més eficient del cicle de la urea. A més, els nostres resultats sobre els nivells de triglicèrids són consistents amb estudis previs que suggereixen que el consum d'insectes pot reduir l'absorció intestinal dels lípids de la dieta a causa dels seus pèptids bioactius o contingut en quitina.⁶⁸ En conjunt, aquesta evidència confirma que no hi ha efectes del consum d'insectes que comprometin la salut de les rates i també suggereix que les dietes basades en insectes poden ser metabòlicament beneficioses, com han apuntat recentment Kang *et al.*⁶⁹ Curiosament, els mateixos autors van trobar una millora paral·lela del perfil de microbiota, augmentant la diversitat i els tàxons de bacteris beneficiosos quan la dieta inclou *T. molitor* i *A. diaperinus*,⁷⁰ però van recomanar més investigació sobre com poden estar relacionats amb els beneficis metabòlics. Una altra hipòtesi podria ser que la millora de l'estat inflamatori també afecta l'estat metabòlic, ja que TNF- α i interleucines-1 estan relacionades amb induir alteracions metabòliques.⁷¹ Malgrat que els nostres resultats del **manuscrit 1** no permeten explicar aquests efectes, potser per les dosis baixes d'insecte, la millora dels nivells d'IL-10 i IL18 en l'estudi del **manuscrit 3** dona suport a aquesta hipòtesi.

A més, en aquest context, el nostre estudi de correlació també va revelar algunes associacions interessants entre els receptors del gust intestinal i els paràmetres analitzats bioquímicament (**manuscrit 2**). Els nostres resultats donen suport a la idea d'una possible relació entre els receptors intestinals del gust amarg i el metabolisme lipídic,⁷² ja que els nivells de triglicèrids i colesterol estan altament correlacionats amb aquests receptors. A més, investigacions recents han millorat la nostra comprensió, ja que han demostrat que el colesterol actua com un agonista dels receptors del gust amarg, i n'afecta la funció.^{73,74} En conjunt, aquestes troballes posen de manifest la interacció entre el metabolisme lipídic i les vies de senyalització dels receptors del gust, i obren potencialment noves vies per comprendre i tractar malalties metabòliques. A més, el nostre estudi va identificar correlacions entre els nivells plasmàtics de creatinina i urea amb els receptors del gust umami jejunal, i això suggereix possibles vincles entre la percepció del gust umami i el metabolisme dels aminoàcids. Se sap que el glutamat

i l'aspartat de la dieta es metabolitzen a l'intestí en diversos productes, inclosos els metabòlits de la urea.^{75, 76} A més, els nostres resultats que descriuen que el consum d'insectes pot contrarestar els canvis metabòlics induïts per condicions inflamatòries (**manuscrits 1 i 3**) reforcen el vincle entre els nivells d'L-aminoàcids que arriben al jejú i urea plasmàtica. No obstant això, les correlacions observades també suggereixen un possible paper dels receptors del gust umami en la regulació del metabolisme del nitrogen. En conjunt, les troballes plantegen preguntes intrigants sobre els efectes sistèmics de la modulació del receptor del gust més enllà del sistema digestiu. Però aquestes suposicions es basen en gran mesura en les nostres observacions i hipòtesis derivades de la literatura existent, i no podem demostrar definitivament els efectes de modular l'expressió gènica dels receptors del gust. Les investigacions futures seran crucials per demostrar aquestes relacions i validar les hipòtesis presentades.

En resum, els resultats presentats en aquesta tesi descriuen parcialment els efectes sobre la salut del consum d'una font proteica inusual, d'alta qualitat i producció respectuosa amb el medi ambient, amb una alta ràtio de conversió de pinso, altes taxes de fertilitat i cicles de vida curts.⁷⁷

Al llarg del nostre estudi, hem descobert associacions entre els receptors del gust i altres paràmetres analitzats, que estableixen les bases per a futures investigacions sobre els mecanismes i el significat d'aquestes relacions. En concret, vam trobar que les dietes basades en insectes poden influir en l'expressió dels receptors del gust umami i amarg a l'intestí, que afectaven potencialment la detecció de nutrients, la secreció d'hormones enteroendocrines i la regulació inflamatòria en el tracte gastrointestinal. No obstant això, és important reconèixer algunes limitacions. En primer lloc, la nostra anàlisi es va limitar al nivell d'expressió gènica, que proporcionava una instantània de l'activitat dels receptors del gust sense avaluar l'expressió o localització de proteïnes. No obstant això, Lipchock *et al.* han informat en dos estudis que la percepció de l'amargor està correlacionada amb l'abundància d'ARNm del receptor amarg,^{78, 79} la qual cosa podria indicar que els nivells d'ARNm d'aquests receptors estan altament relacionats amb els nivells de proteïna capaç de reconèixer els compostos específics. A més, una major investigació de l'expressió proteica dels receptors del gust, particularment en el costat apical dels enteròcits i en diferents llocs de l'intestí, podria dilucidar les implicacions funcionals dels canvis en l'expressió gènica que hem observat. Tècniques com la transferència de proteïnes i la immunohistoquímica podrien complementar la nostra anàlisi d'expressió d'ARNm i proporcionar informació sobre la localització, abundància i vies de senyalització de proteïnes. A més, el nostre estudi va analitzar tot el teixit intestinal sense resolució específica en l'àmbit cel·lular. Malgrat que aquest enfocament proporciona una visió general dels canvis en l'expressió dels receptors del gust, futures investigacions podrien beneficiar-se d'anàlisis específiques de cèl·lules per

descobrir el paper precís dels receptors del gust en diferents tipus cel·lulars dins del tracte intestinal. Per exemple, l'estudi de l'expressió dels receptors del gust en cèl·lules enteroendocrines, cèl·lules de plomall o cèl·lules immunitàries podria proporcionar informació sobre la seva importància funcional més enllà de la detecció de nutrients. A més, estudis com els recents de Shon *et al.* o Feng *et al.*^{65, 80} que analitzin l'impacte dels receptors del gust i estudiïn les seves vies de senyalització en diferents situacions, podrien conduir a una millor comprensió de la importància dels receptors del gust i a un bon desenvolupament de noves estratègies terapèutiques i intervencions dietètiques en situacions de patologia.

D'altra banda, els nostres resultats van mostrar respostes saludables en termes d'inflamació sistèmica i intestinal, resposta al·lèrgica i morfologia intestinal en rates després de suplementos crònics a dosis baixes d'insectes o consum de dieta basada en insectes. A més, els nostres resultats suggereixen que el consum d'una dieta basada en insectes com a font proteica podria millorar algunes variables metabòliques, inflamatòries i intestinals alterades per una inflamació de baix grau, com passa en l'obesitat. Per això, el nostre estudi proporciona una anàlisi exhaustiva per demostrar els efectes sobre la salut del consum d'insectes en estats saludables i inflamatoris. No obstant això, calen més estudis sobre els efectes dels compostos bioactius continguts en insectes comestibles en la salut humana per validar el potencial dels insectes comestibles com una nova mesura per combatre l'obesitat i promoure la salut en general.⁸¹

Referències

1. MIGUÉNS-GÓMEZ, A., *et al.* (2023). «Administration of *Alphitobius diaperinus* or *Tenebrio molitor* before meals transiently increases food intake through enterohormone regulation in female rats». *J Sci Food Agric* 103: 1660-1667.
2. SELALEDI, L.; MBAJIORGU, C. A.; MABELEBELE, M. (2020). «The use of yellow mealworm (*T. molitor*) as alternative source of protein in poultry diets: a review». *Trop Anim Health Prod* 52: 7-16.
3. ROS-BARÓ, M., *et al.* (2022). «Edible insect consumption for human and planetary health: a systematic review». *Int J Environ Res Public Health* 19: 11653.
4. TURCK, D., *et al.* (2022). «Safety of frozen and freeze-dried formulations of the lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus* larva) as a Novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283 EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA)». *EFSA Journal* 20: 7325.
5. TURCK, D., *et al.* (2021). «Safety of dried yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283». *EFSA Journal* 19.
6. LI, D. P.; CUI, M.; TAN, F.; LIU, X. Y.; YAO, P. (2021). «High red meat intake exacerbates dextran sulfate-induced colitis by altering gut microbiota in mice». *Front Nutr* 8: 646819.
7. MANDALARI, G.; GERVASI, T.; ROSENBERG, D. W.; LAPSLEY, K. G.; BAER, D. J. (2023). «Effect of nuts on gastrointestinal health». *Nutrients* 15: 1733.
8. AGUILAR-TOALÁ, J. E.; CRUZ-MONTERROSA, R. G.; LICEAGA, A. M. (2022). «Beyond human nutrition of edible insects: health benefits and safety aspects». *Insects* 13: 1007.
9. GIL-CARDOSO, K., *et al.* (2019). «Protective effect of proanthocyanidins in a rat model of mild intestinal inflammation and impaired intestinal permeability induced by LPS». *Mol Nutr Food Res* 63.
10. GIL-CARDOSO, K., *et al.* (2017). «A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats». *Br J Nutr* 117: 218-229.
11. GINÉS, I., *et al.* (2018). «Effects of an intermittent grape-seed proanthocyanidin (GSPE) treatment on a cafeteria diet obesogenic challenge in rats». *Nutrients* 10: 315.
12. GONZÁLEZ-QUILEN, C., *et al.* (2019). «Grape-seed proanthocyanidins are able to reverse intestinal dysfunction and metabolic endotoxemia induced by a cafeteria diet in Wistar rats». *Nutrients* 11.

13. GU, Y. F., *et al.* (2022). «Dietary chitooligosaccharide supplementation alleviates intestinal barrier damage, and oxidative and immunological stress in lipopolysaccharide-challenged laying hens». *Poult Sci* 101.
14. IM, E.; RIEGLER, F. M.; POTHOUKAKIS, C.; RHEE, S. H. (2012). «Elevated lipopolysaccharide in the colon evokes intestinal inflammation, aggravated in immune modulator-impaired mice». *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303: 490-497.
15. VASILOPOULOS, S., *et al.* (2024). «Diet replacement with whole insect larvae affects intestinal morphology and microbiota of broiler chickens». *Sci Rep* 14.
16. PHAENGPHAIRREE, P.; BOONTIAM, W.; WEALLEANS, A.; HONG, J.; KIM, Y. Y. (2023). «Dietary supplementation with full-fat *Hermetia illucens* larvae and multi-probiotics, as a substitute for antibiotics, improves the growth performance, gut health, and antioxidative capacity of weaned pigs». *BMC Vet Res* 19.
17. MALEMATJA, E.; MANYELO, T. G.; SEBOLA, N. A.; MABELEBELE, M. (2023). «The role of insects in promoting the health and gut status of poultry». *Comp Clin Path* 32: 501-513.
18. IBITOYE, E. B., *et al.* (2019). «Gut health and serum growth hormone levels of broiler chickens fed dietary chitin and chitosan from cricket and shrimp». *Poult Sci* 98: 745.
19. LAN, R.; CHANG, Q.; WEI, L.; ZHAO, Z. (2021). «The protect effects of chitosan oligosaccharides on intestinal integrity by regulating oxidative status and inflammation under oxidative stress». *Mar Drugs* 19.
20. PIETRZAK, B.; TOMELA, K.; OLEJNIK-SCHMIDT, A.; MACKIEWICZ, A.; SCHMIDT, M. (2020). «Secretory IgA in intestinal mucosal secretions as an adaptive barrier against microbial cells». *Int J Mol Sci* 21: 1-15.
21. GIL-CARDOSO, K., *et al.* (2018). «The co-administration of proanthocyanidins and an obesogenic diet prevents the increase in intestinal permeability and metabolic endotoxemia derived to the diet». *J Nutr Biochem* 62: 35-42.
22. KAMILA, T.; AGNIESZKA, K. (2021). «An update on extra-oral bitter taste receptors». *J Transl Med* 19: 440.
23. JALŠEVAC, F., *et al.* (2022). «The hidden one: what we know about bitter taste receptor 39». *Front Endocrinol (Lausana)* 13.
24. ZHANG, Y., *et al.* (2003). «Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways». *Cell* 112: 293-301.
25. BEHRENS, M.; LANG, T. (2022). «Extra-oral taste receptors—function, disease, and perspectives». *Front Nutr* 9: 881177.

26. MCCLUSKEY, L. P.; HE, L.; DONG, G.; HARRIS, R. (2020). «Chronic exposure to liquid sucrose and dry sucrose diet have differential effects on peripheral taste responses in female rats». *Appetite* 145: 104499.
27. CAREMOLI, F., et al. (2023). «Microbiota-dependent upregulation of bitter taste receptor subtypes in the mouse large intestine in high-fat diet-induced obesity». *Nutrients* 15.
28. ZHANG, Y., et al. (2023). «Nutritive/non-nutritive sweeteners and high fat diet contribute to dysregulation of sweet taste receptors and metabolic derangements in oral, intestinal and central nervous tissues». *Eur J Nutr* 62: 3149-3159.
29. WIDMAYER, P.; KÜPER, M.; KRAMER, M.; KÖNIGSRAINER, A.; BREER, H. (2012). «Altered expression of gustatory-signaling elements in gastric tissue of morbidly obese patients». *Int J Obes (Londres)* 36: 1353.
30. SMITH, N. J.; GRANT, J. N.; MOON, J. I.; SO, S. S.; FINCH, A. M. (2021). «Critically evaluating sweet taste receptor expression and signaling through a molecular pharmacology lens». *FEBS J* 288: 2660-2672.
31. SHAHBANDI, A. A.; CHOO, E.; DANDO, R. (2018). «Receptor regulation in taste: can diet influence how we perceive foods?» *J* 1: 106-115.
32. TIAN, M., et al. (2019). «Branched chain amino acids stimulate gut satiety hormone cholecystokinin secretion through activation of the umami taste receptor T1R1/T1R3 using an in vitro porcine jejunum model». *Food Funct* 10: 3356-3367.
33. ZHANG, J., et al. (2013). «Oral administration of MSG increases expression of glutamate receptors and transporters in the gastrointestinal tract of young piglets». *Amino Acids* 45: 1169-1177.
34. DAI, J.; LOV, J.; MARTIN-ARROWSMITH, P. W.; GRITSAS, A.; CHURCHWARD-VENNE, T. A. (2022). «The acute effects of insect vs. beef-derived protein on postprandial plasma aminoacidemia, appetite hormones, appetite sensations, and energy intake in healthy young men». *Eur J Clin Nutr* 76: 1548-1556.
35. LANNG, S. K., et al. (2021). «Partial substitution of meat with insect (*Alphitobius diaperinus*) in a carnivore diet changes the gut microbiome and metabolome of healthy rats». *Foods* 10: 1814.
36. SHACKLEY, M., et al. (2020). «Short chain fatty acids enhance expression and activity of the umami taste receptor in enteroendocrine cells via a $G\alpha_{i/o}$ pathway». *Front Nutr* 7: 568991.
37. RICHTER, P., et al. (2022): «Bitter peptides YFYPEL, VAPFPEVE, and YQEPVLGPVRGPFPIIV, released during gastric digestion of casein, stimulate mechanisms of gastric acid secretion via bitter taste receptors TAS2R16 and TAS2R38». *J. Agric. Food Chem* 2022: 11591-11602.

38. KIM, M. J.; SON, H. J.; KIM, Y.; MISAKA, T.; RHYU, M.-R. (2015). «Umami-bitter interactions: the suppression of bitterness by umami peptides via human bitter taste receptor». *Biochem Biophys Res Commun* 456: 586-590.
39. MAHASHI, K.; HUANG, L. (2009). «Bitter peptides and bitter taste receptors». *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 1661-1671.
40. KARAMETSI, K.; KOKKINIDOU, S.; RONNINGEN, I.; PETERSON, D. G. (2014). «Identification of bitter peptides in aged cheddar cheese». *J Agric Food Chem* 62: 8034-8041.
41. KOHL, S.; BEHRENS, M.; DUNKEL, A.; HOFMANN, T.; MEYERHOF, W. (2013). «Amino acids and peptides activate at least five members of the human bitter taste receptor family». *J Agric Food Chem* 61: 53-60.
42. COVASA, M.; STEPHENS, R. W.; TODEREAN, R.; COBUZ, C. (2019). «Intestinal sensing by gut microbiota: targeting gut peptides». *Front Endocrinol (Lausana)* 10: 82.
43. LEUNG, R.; COVASA, M. (2021). «Do gut microbes taste?». *Nutrients* 13.
44. TIROCH, J., et al. (2023). «Human gingival fibroblasts as a novel cell model describing the association between bitter taste thresholds and interleukin-6 release». *J Agric Food Chem* 71: 5314-5325.
45. ZHENG, X., et al. (2019). «Gingival solitary chemosensory cells are immune sentinels for periodontitis». *Nat Commun* 10.
46. KOH, G. Y.; ROWLING, M. J.; PRITCHARD, S. K. (2022). «Possible role of type 1 and type 2 taste receptors on obesity-induced inflammation». *Nutr Rev* 80: 1919-1926.
47. GOODMAN, J. R.; DANDO, R. (2021). «To detect and reject, parallel roles for taste and immunity». *Curr Nutr Rep* 10: 137.
48. TURNER, A., et al. (2019). «Interactions between taste receptors and the gastrointestinal microbiome in inflammatory bowel disease». *J Nutr Intermed Metab* 18: 100106.
49. WELCOME, M. O.; DOGO, D.; NIKOS E. (2023). «Mastorakis. Cellular mechanisms and molecular pathways linking bitter taste receptor signalling to cardiac inflammation, oxidative stress, arrhythmia and contractile dysfunction in heart diseases». *Inflammopharmacology* 31: 89.
50. DESCAMPS-SOLÀ, M., et al. (2023). «Bitter taste receptors along the gastrointestinal tract: comparison between humans and rodents». *Front Nutr* 10.
51. IWATSUKI, K.; TORII, K. (2012). «Peripheral chemosensing system for tastants and nutrients». *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 19: 19-25.

52. KENDIG, D. M., *et al.* (2014). «Activation of the umami taste receptor (T1R1/T1R3) initiates the peristaltic reflex and pellet propulsion in the distal colon». *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307: G1100.
53. PRANDI, S., *et al.* (2013). «A subset of mouse colonic goblet cells expresses the bitter taste receptor Tas2r131». *PLoS One* 8.
54. SCHNEIDER, C.; O'LEARY, C. E.; LOCKSLEY, R. M. (2019). «Regulation of immune responses by tuft cells». *Nat Rev Immunol* 19: 584.
55. BURCLAFF, J., *et al.* (2022). «A proximal-to-distal survey of healthy adult human small intestine and colon epithelium by single-cell transcriptomics». *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 13: 1554-1589.
56. KERTESZ, Z.; HARRINGTON, E. O.; BRAZA, J.; GUARINO, B. D.; CHICHGER, H. (2022). «Agonists for bitter taste receptors T2R10 and T2R38 attenuate LPS-induced permeability of the pulmonary endothelium in vitro». *Front Physiol* 13: 794370.
57. SCHLEIMER, R. P.; KATO, A.; KERN, R.; KUPERMAN, D.; AVILA, P. C. (2007). «Epithelium: At the interface of innate and adaptive immune responses». *J Allergy Clin Immunol* 120: 1279.
58. KREMPSKI, J. W.; DANT, C.; NADEAU, K. C. (2020). «The origins of allergy from a systems approach». *Ann Allergy Asthma Immunol* 125: 507-516.
59. VAN REE, R.; HUMMELSHØJ, L.; PLANTINGA, M.; POULSEN, L. K.; SWINDLE, E. (2014). «Allergic sensitization: host-immune factors». *Clin Transl Allergy* 4: 1-9.
60. STULL, V. J., *et al.* (2018). «Impact of edible cricket consumption on gut microbiota in healthy adults, a double-blind, randomized crossover trial». *Sci Rep* 8.
61. ACOSTA-ESTRADA, B. A.; REYES, A.; ROSELL, C. M.; RODRIGO, D.; IBARRA-HERRERA, C. C. (2021). «Benefits and Challenges in the Incorporation of Insects in Food Products». *Front Nutr* 8: 687712.
62. ZIELIŃSKA, E.; BARANIAK, B.; KARAŚ, M. (2018). «Identification of antioxidant and anti-inflammatory peptides obtained by simulated gastrointestinal digestion of three edible insects species (*Gryllodes sigillatus*, *Tenebrio molitor*, *Schistocerca gregaria*)». *Int J Food Sci Technol* 53: 2542-2551.
63. VERBEKE, K. A., *et al.* (2015). «Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics». *Nutr Res Rev* 28: 42.
64. REYNOLDS, C. M.; SEGOVIA, S. A.; ZHANG, X. D.; GRAY, C.; VICKERS, M. H. (2015). «Maternal high-fat diet-induced programming of gut taste receptor and inflammatory gene expression in rat offspring is ameliorated by CLA supplementation». *Physiol Rep* 3.

65. FENG, P., et al. (2018). «Aggravated gut inflammation in mice lacking the taste signaling protein α -gustducin». *Brain Behav Immun* 71: 23.
66. HERMANS, W.J. H., et al. (2021). «Insects are a viable protein source for human consumption: from insect protein digestion to postprandial muscle protein synthesis in vivo in humans: a double-blind randomized trial». *Am J Clin Nutr* 114: 934-944.
67. SALAZAR, J. H. (2014). «Overview of urea and creatinine». *Lab Med* 45: e19-e20.
68. ESCOBAR-ORTIZ, A., et al. (2022). «Consumption of cricket (*Acheta domestica*) flour decreases insulin resistance and fat accumulation in rats fed with high-fat and -fructose diet». *J Food Biochem* 46: e14269.
69. KANG, Y., et al. (2023). «Yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) and lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*) proteins slowed weight gain and improved metabolism of diet-induced obesity mice». *Journal of Nutrition* 153: 2237-2248.
70. KANG, Y.; OBA, P. M.; GAULKE, C. A.; Sánchez-Sánchez, L.; SWANSON, K. S. (2023). «Dietary inclusion of yellow mealworms (*T. molitor*) and lesser mealworms (*A. diaperinus*) modifies intestinal microbiota populations of diet-induced obesity mice». *J Nutr* 153: 3220-3236.
71. SEEMANN, S.; ZOHLES, F.; LUPP, A. (2017). «Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation». *J Biomed Sci* 24.
72. SAFE, S. H.; KATO, E.; OSHIMA, S. (2023). «Association of bitter taste receptors with obesity and diabetes and their role in related tissues». *Receptors* 2: 251-263.
73. DI PIZIO, A. (2024). «A bitter taste receptor activated in a surprising way». *Nature* 628: 506-507.
74. KIM, Y., et al. (2024). «Bitter taste receptor activation by cholesterol and an intracellular tastant». *Nature* 628: 664-671.
75. WINDMUELLER, H. G.; SPAETH, A. E. (1980). «Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats. Quantitative importance of glutamine, glutamate, and aspartate». *Journal of Biological Chemistry* 255: 107-112.
76. TOMÉ, D. (2018). «The roles of dietary glutamate in the intestine». *Ann Nutr Metab* 73: 15-20.
77. LICEAGA, A. M.; ELEAZAR AGUILAR-TOALÁ, J.; VALLEJO-CORDOBA, B.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A. (2022). «Insects as an alternative protein source». *Rev Food Sci Technol* 13: 19-34.

78. LIPCHOCK, S. V., *et al.* (2017). «Caffeine bitterness is related to daily caffeine intake and bitter receptor mRNA abundance in human taste tissue». *Perception* 46: 245-256.
79. LIPCHOCK, S. V.; MENNELLA, J. A.; SPIELMAN, A. I.; REED, D. R. (2013). «Human bitter perception correlates with bitter receptor messenger RNA expression in taste cells». *Am J Clin Nutr* 98: 1136-1143.
80. SHON, W. J., *et al.* (2023). «Gut taste receptor type 1 member 3 is an intrinsic regulator of Western diet-induced intestinal inflammation». *BMC Med* 21: 1-22.
81. LANGE, K. W.; NAKAMURA, Y. (2023). «Edible insects and their potential anti-obesity effects: a review». *Food Science of Animal Products* 1: 9240008.

Conclusions

Les principals conclusions de la present tesi doctoral són les següents:

1. Baixes dosis cròniques d'insectes provoquen una resposta saludable en la funció intestinal i el benestar general

- *A. diaperinus* va exercir una resposta immunitària intestinal ex vivo més saludable que altres fonts de proteïnes més comunes en el còlon humà.
- En rates sanes, la suplementació amb insectes no va alterar la barrera intestinal ni els paràmetres metabòlics, inflamatoris o al·lèrgens sistèmics.
- La suplementació d'insectes va augmentar la capacitat d'absorció intestinal en rates sanes i tractades amb LPS.
- La suplementació d'insectes no va exacerbar la disrupció inflamatòria, metabòlica o intestinal induïda per la injecció d'LPS.
- La suplementació amb insectes va alleugerir l'alteració de la glucèmia i la urèmia causades per la injecció d'LPS.
- Els efectes observats no són específics de cada espècie, ja que no es van observar diferències entre la suplementació amb *A.diaperinus* i *T. molitor*.

2. La suplementació amb insectes modula l'expressió dels receptors intestinals del gust, i està relacionada amb respostes intestinals, metabòliques i inflamatòries

- Els receptors del gust umami i amarg al còlon són els més sensibles a la suplementació amb insectes.
- El Tas1r1 a còlon va ser seleccionat com la variable clau per discriminar entre grups control i suplementats amb insectes.

- L'expressió dels receptors del gust en diferents segments de l'intestí es correlaciona amb diversos paràmetres fisiològics, inclosa la resposta immunitària local, i marcadors metabòlics i inflamatoris sistèmics.

3. Una dieta basada en insectes com a font única de proteïnes condueix a un perfil metabòlic i inflamatori diferent en comparació amb altres fonts proteiques

- En un estat saludable, les dietes basades en insectes resulten en un metabolisme nitrogenat i lipídic diferent de les dietes basades en carn de boví.
- Les dietes basades en insectes tornen a modular algunes expressions dels receptors gustatius de jejú i còlon.
- El consum de dietes basades en insectes va mostrar un perfil proinflamatori més baix que les dietes basades en altres fonts proteiques convencionals, en condicions de salut i obesitat.
- La dieta basada en insectes va alleujar els trastorns de dislipèmia i urèmia induïts per la condició obesogènica.

Annex

Articles publicats

- SEGÚ, H.**; JALŠEVAC, F.; PINENT, M.; ARDEVOL, A.; TERRA, X.; BLAY, M. T. (2022). «Intestinal morphometric changes induced by a Western-style diet in Wistar rats and GSPE counter-regulatory effect». *Nutrients* 14 (13): 2608. <<https://doi.org/10.3390/NU14132608>>. PMID: 35807788; PMCID: PMC9268310.
- MIGUÉNS-GÓMEZ, A.; SIERRA-CRUZ, M.; **SEGÚ, H.**; BELTRÁN-DEBÓN, R.; RODRÍGUEZ-GALLEGU, E.; TERRA, X.; BLAY, M. T.; PÉREZ-VENDRELL, A. M.; PINENT, M.; ARDEVOL, A. (2023). «Administration of *Alphitobius diaperinus* or *Tenebrio molitor* before meals transiently increases food intake through enterohormone regulation in female rats». *J Sci Food Agric* 103 (4): 1660-1667. <<https://doi.org/10.1002/JSFA.12305>>. PMID: 36324158; PMCID: PMC10099498.
- SEGÚ, H.**; JALŠEVAC, F.; SIERRA-CRUZ, M.; FELIU, F.; MOVASSAT, J.; RODRÍGUEZ-GALLEGU, E.; TERRA, X.; PINENT, M.; ARDEVOL, A.; BLAY, M. T. (2024). «Assessing the impact of insect protein sources on intestinal health and disease: insights from human ex vivo and rat in vivo models». *Food and Function* 15 (8): 4552-4563. <<https://doi.org/10.1039/D4FO00381K>>. PMID: 38584501.

Articles enviats

- SEGÚ, H.**; JALŠEVAC, F.; LORES, M.; BELTRÁN-DEBÓN, R.; TERRA, X.; PINENT, M.; ARDEVOL, A.; RODRÍGUEZ-GALLEGU, E.*; BLAY, M.T. (2024). «Intestinal taste receptor expression and its implications for health: an integrative analysis in female rats after chronic insect supplementation». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (20 de gener).
- JALŠEVAC, F.; DESCAMPS-SOLÀ, M.; GRAU-BOVÉ, C.; **SEGÚ, H.**; AUGUET, T.; AVILÉS-JURADO, F.X.; BALAGUER, F.; JORBA, R.; BELTRÁN-DEBÓN, R.; BLAY, M.T.

- TERRA, X.; PINENT, M.; ARDÉVOL, A. (2024). «Profiling bitter taste receptors (TAS2R) along the gastrointestinal tract and their influence on enterohormone secretion. gender- and age-related effects in the colon». *Plos Biology* (26 d'abril).
- JALŠEVAC, F.; DESCAMPS-SOLÀ, M.; VILALTA, A.; SEGÚ, H.; BLAY, M. T.; BELTRÁN-DEBÓN, R.; RODRÍGUEZ-GALLEGO, E.; TERRA, X.; ARDÉVOL, A.; PINENT, M. (2024). «Subchronic modulation of bitter taste receptors (TAS2R) by procyanidins. Unravelling the complex interplay between stimulation and expression». *Food and Function* (15 de maig).
- JALŠEVAC, F.; SEGÚ, H.; BALAGUER, F.; OCAÑA, T.; MOREIRA, R.; GRÀCIA-SANCHO, J.; FERNANDEZ, A.; ANDRES-LACUEVA, C.; MARTÍNEZ, M.; BELTRÁN-DEBÓN, R.; RODRÍGUEZ-GALLEGO, E.; TERRA, X.; ARDÉVOL, A.; PINENT, M. (2024). «TASR5 and TAS2R38 are bitter taste receptors whose colonic expressions play important roles in age-associated processes». *Molecular Metabolism* (17 de maig).

Articles en preparació

- SEGÚ, H.; LORES, M.; SOLER, O.; COLOM-PELLICER, M.; JALŠEVAC, F.; BELTRÁN-DEBÓN, R.; TERRA, X.; PINENT, M.; ARDÉVOL, A.; RODRÍGUEZ-GALLEGO, E.*; BLAY, M.T. «Examining the impact of insect-based diets on intestinal and overall health, in healthy and diet-induced obese rats».

Llista de pòsters i comunicacions orals

Setembre de 2021. Participació en l'eNuGO Week 2021: «Immuno-nutrigenomics: how to feed the immune system». Sessió de pòsters: «Chronic insect administration effect on behavioural, morphometrical, biochemical and immunological parameters in Wistar female rats».

Novembre de 2021. Participació en el I Congreso Internacional en Ciencias Biomédicas. Sessió de pòsters: «Efecto de la administración crónica de insecto en los parámetros de comportamiento, morfométricos, bioquímicos e inmunológicos de ratas hembra Wistar».

Setembre de 2022. Participació en el NuGO Week 2022: «Food bioactives for disease prevention: from mechanisms to chrononutrition», Tarragona. Sessió de pòsters: «Intestinal morphometric changes induced by a Western-style diet in Wistar rats and GSPE counter-regulatory effect».

Abril de 2023. Participació en la sessió científica «On es dirigeix la recerca en nutrició? Tendències i necessitats de la societat», organitzada pel CCNIEC, Barcelona. «Efecte

de noves fonts de proteïna (*Alphitobius diaperinus* i *Tenebrio molitor*) sobre la resposta immunològica intestinal en rates Wistar i humans».

Setembre de 2023. Participació en el Food Bioactives and Health, Praga. «Modulation of the expression of umami, sweet and bitter taste receptors in Wistar rats by the insect protein consumption».

Novembre de 2023. Participació en el Retreat 2023, organitzat per l'IISPV. Arnes (Terra Alta). Comunicació oral: «Effect of novel protein sources (*Alphitobius diaperinus* and *Tenebrio molitor*) on intestinal immune response in rats and humans».

Resum

El consum d'insectes està guanyant atenció a causa de la percepció de sostenibilitat i beneficis per a la salut. En comparació amb les fonts tradicionals de proteïnes, el cultiu d'insectes és més respectuós amb el medi ambient, ja que usa residus orgànics, emet menys gasos d'efecte hivernacle i requereix menys aigua. A més, els insectes aporten un alt valor nutricional, que inclou aminoàcids essencials i micronutrients, alhora que contenen compostos bioactius com pèptids i antioxidants. Aquests compostos són prometedors per reduir el risc de malalties cròniques, millorar la funció immunitària i promoure la salut intestinal. No obstant això, es requereixen més estudis per dilucidar les implicacions que té el consum d'insectes per a la salut i millorar-ne l'acceptació social. En aquest sentit, la salut del tracte intestinal és vital per al benestar general, ja que serveix com a primera barrera de l'organisme contra aliments i patògens. A més, la presència de receptors del gust a l'intestí, que se sap que tenen efectes fisiològics més enllà del seu paper en la percepció del gust, posa de manifest el potencial de les tries dietètiques per influir en la salut intestinal i general a través d'aquests receptors.

En aquest context, aquesta tesi examina l'impacte del consum d'insectes en la salut intestinal i, subseqüentment, en les respostes sistèmiques, tant en condicions de salut com d'inflamació induïda en rates. A més, investiga la possible modulació dels receptors del gust intestinal per insectes i les seves implicacions per a la salut.

Els resultats demostren que l'administració de *Tenebrio molitor* i *Alphitobius diaperinus* en rates Wistar amb dieta estàndard no té efectes adversos sobre la salut. De fet, la suplementació amb insectes millora alteracions en la urèmia, la glucèmia i la superfície intestinal induïdes per la injecció d'LPS. La suplementació amb insectes modula l'expressió del receptor del gust umami i amarg, principalment al còlon, i té implicacions en les respostes metabòliques i inflamatòries. D'altra banda, el consum d'*Alphitobius diaperinus*, com a font única de proteïnes de la dieta, resulta en un perfil menys proinflamatori en comparació amb les fonts de proteïnes convencionals i va in-

duir canvis en l'estat metabòlic en rates sanes. A més, el consum d'aquesta dieta basada en insectes atenua algunes alteracions associades a un estat d'obesitat i en millora l'estat inflamatori i metabòlic.

En conclusió, la present tesi demostra efectes favorables del consum d'insectes en la salut intestinal, així com la millora inflamatòria i metabòlica quan els insectes es consumeixen de manera crònica tant en condicions saludables com patològiques. A més, els resultats reforcen la idea que l'expressió dels receptors intestinals del gust és altament susceptible a canvis en els patrons dietètics i l'estat de salut, i suggereixen la seva implicació en diverses funcions importants, inclosos els processos immunitaris i metabòlics.

Abstract

The consumption of insects is gaining attention due to its perceived sustainability and health benefits. Compared to traditional protein sources, insect farming is more environmentally friendly, utilising organic waste, emitting fewer greenhouse gases, and requiring less water. Moreover, insects provide a high nutritional value, including essential amino acids and micronutrients, while also containing bioactive compounds like peptides and antioxidants. These compounds show promise in reducing chronic disease risk, improving immune function, and promoting intestinal health. Nevertheless, further research is required to elucidate the health implications of insect consumption and to enhance social acceptance. In this sense, the intestinal tract's health is vital for overall well-being, as it serves as the body's first barrier against food and pathogens. Additionally, the presence of taste receptors in the intestine, which are known to have physiological effects beyond their role in taste perception, highlights the potential for dietary choices to influence intestinal and overall health through these receptors.

In this context, the current thesis examines the impact of insect consumption on intestinal health and, subsequently, on systemic responses, in both healthy and induced inflammation conditions in rats. Furthermore, it investigates the potential modulation of intestinal taste receptors by insects and its health implications.

The results demonstrate that the administration of *Tenebrio molitor* and *Alphitobius diaperinus* to normal chow-feed Wistar rats have no adverse health effects. In fact, supplementation with insects improve alterations in uraemia, glycaemia, and intestinal surface area induced by LPS injection. Insect supplementation modulates umami and bitter taste receptor expression, primarily in the colon, and it has implications for metabolic and inflammatory responses. On the other hand, consumption of *Alphitobius diaperinus*, as a unique source of protein in the diet, resulted in a less pro-inflammatory profile compared to conventional protein sources and induced changes in metabolic status in healthy rats. Additionally, consumption

of this insect-based diet attenuates some alterations associated with an obesogenic status, ameliorating inflammatory and metabolic disturbances.

In conclusion, the present thesis demonstrates favourable effects of insect consumption intestinal health as well as inflammatory and metabolic amelioration when insects are consumed chronically in both healthy and pathological conditions. Furthermore, the results reinforce the idea that the expression of intestinal taste receptors is highly susceptible to changes in dietary patterns and health status and suggest its involvement in several important functions including immune and metabolic processes.

El consum d'insectes emergeix com una alternativa proteica sostenible amb un gran potencial per a la salut. Aquest llibre analitza com els seus nutrients i compostos bioactius interactuen amb el tracte gastrointestinal, modulant la microbiota, la barrera intestinal i els receptors del gust. A partir d'estudis experimentals, l'obra aporta evidència sobre la seguretat i els possibles beneficis immunitaris i metabòlics d'una alimentació innovadora i respectuosa amb el medi ambient.



PREMI JOSEP M. PUJOL
a la millor tesi en català