RENNAN DE OLIVEIRA CAMINHOTTO

**Concentrações fisiológicas de corpos cetônicos não induzem *browning*
em adipócitos/tecido adiposo: Estudos *in vitro* e *in vivo***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Fabio Bessa Lima

Versão corrigida parcial

São Paulo
2018

RESUMO

Caminhotto RO. Concentrações fisiológicas de corpos cetônicos não induzem *browning* em adipócitos/tecido adiposo: Estudos *in vitro* e *in vivo* [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

Em animais, dietas cetogênicas induzem o *browning* de tecidos adiposos brancos, fenômeno caracterizado pelo aumento de adipócitos capazes de expressar a proteína desacopladora 1 (UCP1) e outros marcadores de gordura marrom em meio a gordura branca. Estudo anterior demonstrou que o β -hidroxibutirato (β HB), principal corpo cetônico, aumenta marcadores do processo de *browning* em adipócitos brancos (*in vitro*) após 24 horas de incubação. No entanto, as doses testadas foram supra-fisiológicas (50 mM) ou apenas encontradas durante a cetoacidose (25 mM). As dietas cetogênicas aumentam a cetonemia em torno de 1-3 mM. O jejum prolongado pode aumentá-lo para 4-7 mM. Uma vez que poderia ser provocada *in vivo* através de intervenções dietéticas, estudamos o impacto de concentrações fisiológicas de β HB no metabolismo e marcadores de *browning* em adipócitos brancos / tecido adiposo em diferentes modelos: adipócitos isolados de ratos Wistar, células 3T3-L1 e *in vivo*, através da suplementação de sais de β HB em ratos Wistar. Demostramos que o β HB: não induz o aparecimento de diferentes marcadores de *browning* (tais como o incremento: da capacidade oxidativa, da atividade de citrato sintase e de genes relacionados ao *browning*) em adipócitos isolados após 24 ou 48 horas de tratamento; não exerce efeito permissivo no *browning* induzido por agonismo β -adrenérgico. Além disso, os adipócitos 3T3-L1 diferenciados com β HB (4mM) tiveram diminuição de 52% na expressão de *Ucp1*, resultado que foi reproduzido no tecido adiposo inguinal subcutâneo de ratos Wistar após a ingestão de sais DL- β HB, onde a expressão gênica de *Ucp1* foi indetectável. Em conclusão, embora as causas de *browning* do tecido adiposo branco induzido por dietas cetogênicas permaneçam inconclusivas, nosso estudo demonstra a incapacidade de, em concentrações fisiológicas, os corpos cetônicos serem, por si, responsáveis por esse fenômeno. Pelo contrário, em algumas situações, o β HB pode prejudicar a expressão da *Ucp1*.

Palavras-chave: Adipócitos. β -hidroxibutirato. *Ucp1*. Mitocôndria.

ABSTRACT

Caminhotto RO. Physiological concentrations of ketone bodies do not induce browning of white adipocytes/adipose tissue: in vitro and in vivo studies. [PhD thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

In animals, ketogenic diets induce browning of white adipose tissue, a phenomenon characterized by the increase of adipocytes capable of expressing the uncoupling protein 1 (UCP1) and other markers of brown fat in among white fat. A previous study demonstrated that β -hydroxybutyrate (β HB), the major ketone body, increases markers of the browning process in white adipocytes (in vitro) after 24 hours of incubation. However, the doses tested were supraphysiological (50 mM) or only found during ketoacidosis (25 mM). Ketogenic diets increase ketonemia by about 1-3 mM. Prolonged fasting can increase it to 4-7 mM. Since it could be elicited in vivo through dietary interventions, we studied the impact of physiological concentrations of β HB on metabolism and browning markers on white adipocytes/adipose tissue in different models: adipocytes isolated from Wistar rats, 3T3-L1 cells and in vivo, through the supplementation of β HB salts in Wistar rats. We demonstrate that β HB does not increase any browning markers (such as: oxidative capacity, citrate synthase activity, and browning related genes expression) in isolated adipocytes after 24 or 48 hours of treatment; does not exert a permissive effect on browning induced by β -adrenergic agonism. In addition, 3T3-L1 adipocytes differentiated with β HB (4mM) had a 52% decrease in *Ucp1* expression, a result that was reproduced in the subcutaneous inguinal adipose tissue of Wistar rats after ingestion of DL- β HB salts, where *Ucp1* expression was undetectable. In conclusion, although the causes of browning of white adipose tissue during ketogenic diets remain inconclusive, our study demonstrates the inability, in physiological concentrations, of ketone bodies themselves to be responsible for this phenomenon. In contrast, in some situations, β HB may impair the expression of *Ucp1*.

Keywords: Adipocytes. β -hydroxybutyrate. Ucp1. Mitochondria.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Programação termogênica de adipócitos

Os tecidos adiposos brancos são importantes reguladores dos níveis de energia sistêmicos. Constituídos, sobretudo, de células adiposas, podem estocar ou liberar energia na forma de ácidos graxos de acordo com demandas sistêmicas, através de controle hormonal. Todavia, suas características de tecido ‘armazenador de energia’ podem ser maleavelmente alteradas e tornar tecidos adiposos sítios de relativa dissipação energética (Wang et al., 2016; Sidossis et al., 2015).

Duas principais classes de adipócitos são encontradas em mamíferos: brancos e marrons. Enquanto aqueles são considerados as unidades funcionais do tecido adiposo branco, estes são tipos celulares encontrados majoritariamente em tecidos adiposos marrons e possuem grande taxa de utilização de substratos energéticos (como glicose e ácidos graxos) para produção de calor em resposta a diversos estímulos. A atividade termogênica das células adiposas marrons depende, em grande parte, da proteína desacopladora 1 (UCP1, do inglês *uncoupling protein 1*). Quando ativada, a UCP1 catalisa um vazamento de prótons através da membrana mitocondrial interna, o que desacopla a respiração oxidativa da síntese de ATP; a energia derivada da oxidação do substrato é então dissipada como calor. Assim, a presença de UCP1 em adipócitos reflete sua capacidade termogênica. (Wang et al., 2016; Fedorenko et al., 2012)

O fenômeno do aumento do número de adipócitos capazes de expressar a UCP1 em meio aos tecidos de gordura branca pôde ser descrito pela caracterização de células adiposas específicas chamadas de adipócitos beges. Essas células se assemelham, por seu fenótipo, aos outros adipócitos brancos e têm baixa expressão de UCP1. No entanto, sob o estímulo apropriado, bem como a gordura marrom clássica, os adipócitos beges respondem com alta expressão (gênica e proteica) de UCP1, acompanhado de aumento da respiração celular, desenvolvendo assim características termogênicas e de maior gasto energético (Wu, et al., 2012). Este fenômeno tem sido denominado

de *browning* (isto é, o desenvolvimento de características termogênicas, que são predominantes no tecido marrom [do inglês, *brown*]) (Harms & Seale, 2013; Wu et al., 2013). Dados sugerem heterogeneidade na origem dessas células adiposas, o que pode variar principalmente de acordo com o coxim adiposo estudado. Por exemplo: aproximadamente 10% dos adipócitos beges positivos para UCP1 na gordura branca subcutânea inguinal são provenientes de precursores do músculo liso que expressam *Myh11*. Por outro lado, um subconjunto de adipócitos beges, presentes nos depósitos subcutâneos anteriores e tecidos adiposos perigonadais, se origina de células positivas para *Myf5*, (Sanchez-Gurmaches et al., 2012) enquanto a maioria dos adipócitos beges da subcutânea inguinal deriva de precursores negativos para *Myf5* (Kajimura, 2015). Tal multiplicidade de origem não é uma característica compartilhada entre células beges e marrons, que são, por sua vez, derivadas de precursor melhor estabelecido.

Todavia, apesar da origem mesenquimal distinta, adipócitos marrons e beges dividem muitas características bioquímicas e morfológicas. 1) eles possuem gotas multiloculares (diferentemente das gotas uniloculares dos adipócitos brancos) e inúmeras mitocôndrias. 2) eles expressam genes relacionados com programação termogênica como: *Ucp1*, da já citada UCP1; *Cidea* (do inglês *cell death-inducing DFFA-like effector A*), de uma proteína associada a gotícula lipídica que promove sua fusão e crescimento, processos essenciais na diferenciação de novos adipócitos bem como para facilitar a hidrólise e a esterificação do triacilglicerol em células metabolicamente ativas (Barneda et al., 2015); *Ppargc1a*, gene da proteína PGC1 α (do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α*), um coativador transcricional que desempenha um papel central em uma rede reguladora que governa a transcrição de genes relacionados à biogênese mitocondrial e função respiratória, bem como da programação termogênica própria do tecido adiposo marrom e bege (Scarpulla et al., 2010); *Prdm16* (do inglês *PR domain containing 16*), um fator de transcrição que regula a programação termogênica de ambos tipos de células adiposas. Apesar de ser dispensável para o desenvolvimento embrionário do tecido adiposo marrom, é necessário para suprimir a expressão de genes próprios de gordura branca

nesse tecido, permitindo assim o aparecimento do fenótipo termogênico na fase pós-natal (Harms et al., 2014). Além de seu papel crítico na determinação e manutenção do fenótipo dos adipócitos marrons, o PRDM16 é necessário para o *browning* induzido por estímulos externos do tecido adiposo branco (isto é, desenvolvimento de adipócitos bege) (Kajimura, 2015). 3) eles tem a capacidade de responder a diversos estímulos termogênicos, como o estímulo β -adrenérgico (Wang et al., 2016).

O principal mecanismo de ativação da programação termogênica e da termogênese em adipócitos, o estímulo β -adrenérgico, ocorre quando as catecolaminas se ligam aos seus receptores β -adrenérgicos, presentes nas membranas das células de gordura, e ativam a enzima amplificadora de sinal adenilato ciclase, através de uma proteína G estimulatória (Gs), o que gera aumento substancial do segundo mensageiro AMPc (monofosfato cíclico de adenosina). Por sua vez, o AMPc se liga a subunidades reguladoras da PKA (proteína quinase A), que, tornando-se ativa, fosforila diversos alvos, incluindo a enzima HSL (lipase hormônio sensível) e perilipinas, tendo por efeito a hidrólise de triacilglicerol intracelular, processo conhecido como lipólise. A liberação de ácidos graxos, particularmente os de cadeia longa, através da hidrólise do triacilglicerol, ativa a UCP1 e aumenta seu efeito desacoplador, que em situações basais permanece inativo, ativando assim a termogênese propriamente dita. Por outro lado, os receptores β -adrenérgicos e a enzima PKA também podem ativar uma cascata de proteínas quinases que culminam com a ativação da MAP quinase p38 que fosforila reguladores transcricionais responsáveis pela biogênese mitocondrial, como o PGC1 α , que também impulsiona a transcrição do gene *Ucp1* (Bordicchia et al., 2012; Cao et al., 2001), o que aqui denominamos programação termogênica.

Em modelos animais, admite-se que a ativação do tecido adiposo marrom, um dos principais sítios de produção de calor, confere efeitos benéficos à adiposidade corporal e à sensibilidade à insulina (Bartelt & Heeren, 2014). No mesmo sentido, em modelos experimentais, a estimulação do aparecimento de adipócitos com características termogênicas em meio de coxins adiposos brancos parece estar relacionada aos mesmos efeitos

metabólicos benéficos da ativação do tecido marrom (Guerra et al., 1998; Rachid et al., 2015), embora este último continue a ser aceito como o território adiposo mais relevante para a termogênese (Shabalina et al., 2013). Ainda, apesar da menor contribuição termogênica quando comparada ao tecido marrom, o bloqueio do desenvolvimento do *browning* em tecidos adiposos brancos aumenta a suscetibilidade ao desenvolvimento de disfunções metabólicas, como obesidade, intolerância à glicose e inflamação, enquanto diminui o gasto de energia e a absorção tecidual de glicose. Por outro lado, o transplante de gorduras reconhecidas por serem predispostas ao *browning* (como a gordura subcutânea inguinal) promove benefícios metabólicos sistêmicos (Cohen et al., 2014).

1.2 Corpos cetônicos e *browning*

Os corpos cetônicos são pequenas moléculas derivadas do catabolismo hepático das gorduras que fornecem energia aos tecidos quando a glicose é escassa, como durante o jejum ou o exercício prolongado. Nessas situações, quando há depleção do glicogênio nas células hepáticas, os ácidos graxos mobilizados dos adipócitos são transportados para o fígado e lá são convertidos em corpos cetônicos, que são então distribuídos através da circulação sanguínea para tecidos metabolicamente ativos, como músculo ou cérebro, onde são metabolizados em acetil-CoA e eventualmente em ATP (Newman & Verdin, 2017).

O termo corpos cetônicos abrange três moléculas geradas durante a cetogênese: β -hidroxibutirato (β HB), acetoacetato e acetona. A maior parte dos corpos cetônicos está na forma de β HB. Quando a cetogênese é ativada, como durante o jejum, os níveis sanguíneos de β HB aumentam muito mais rapidamente do que o acetoacetato ou a acetona. Por isso, a mensuração de sua concentração é considerada o melhor indicativo de cetonemia (Newman & Verdin, 2017).

Em seres humanos, as concentrações séricas de β HB são normalmente baixas (<0.1 mM), mas começam a aumentar significativamente após 12-16 horas de jejum, alcançando 1-2 mM depois de dois dias de jejum e 6-8 mM em

jejuns prolongados (no inglês, *starvation*). Nessas condições, os corpos cetônicos são os substratos energéticos mais abundantemente presentes na circulação, quando comparado à glicose (5mM) e ácidos graxos (0.7-1.2 mM) (Cahill, 2006; Newman & Verdin, 2017). Cabe ressaltar que tais concentrações são fisiológicas, isto é, não são normalmente relacionadas ao quadro de cetoacidose, como o presente em quadros de diabetes, onde a cetonemia pode atingir concentrações sanguíneas de até 25 mM, condição esta que resulta em grave acidose metabólica (Veech et al., 2001). A figura 1. ilustra as possíveis variações da cetonemia em situações fisiológicas.

Figura 1. Ilustração das possíveis variações na cetomenia.

Outras abordagens utilizadas para elevação da cetonemia são as dietas cetogênicas e a suplementação de corpos cetônicos exógenos. As dietas

cetogênicas são caracterizadas pela extrema restrição de carboidratos e aumento de ingestão de gorduras, ao ponto de induzir a cetogênese hepática e presença de cetose, isto é, concentrações detectáveis de corpos cetônicos no plasma. O aumento da cetonemia induzida por tais dietas tende a se fixar em valores fisiológicos, algo entre 0,5 - 3 mM e é geralmente nomeada de 'cetose nutricional'. Em humanos, dietas cetogênicas possuem variada composição: 15-26% de proteínas e 69-80% de gorduras, mas sempre com intensa restrição de carboidratos (>20g dia, ~5% do consumo calórico total (Yancy et al., 2004; Hall et al., 2016). Já em modelos murinos, o percentual de gordura é chega a ser maior (~95% do valor calórico total) porque restrições proteicas também são necessárias (>5% do valor calórico total) para que se estimule mais eficazmente a cetogênese (Kennedy et al., 2007; Bielohudy et al., 2011). Por outro lado, a administração de corpos cetônicos exógenos tem sido uma alternativa para elevação experimental da cetonemia. Corpos cetônicos na forma de ésteres (cetonas associadas a outros substratos precursores de cetogênese) e sais minerais são utilizados eficazmente para mimetizar o aumento da cetonemia encontrada em situações fisiológicas (Stubbs et al., 2017).

Alguns estudos demonstram que dietas cetogênicas induzem à ativação da programação termogênica do tecido adiposo marrom e *browning* da gordura branca (Kennedy et al., 2007; Srivastava et al., 2013; Douris et al., 2017). Também, em animais, os ésteres de cetonas já foram amplamente estudados e os resultados sugerem que talvez a cetose, e não os outros componentes das dietas cetogênicas (como a razão de lipídios/carboidratos ingeridos), pode ser responsável pelo aumento de UCP1 nos tecidos adiposos, marrom e branco (Srivastava et al., 2012). Além disso, camundongos sem receptores β -adrenérgicos (- β 1, β 2 e β 3) alimentados com dieta cetogênica têm o processo de *browning* preservado, em contraste do ocorrido no tecido marrom que teve sua ativação interrompida pela falta de atividade β -adrenérgica do sistema nervoso simpático (Douris et al, 2017), o que sugere fortemente que, diferente da gordura marrom, fatores circulantes podem ser diretamente responsáveis pela indução do *browning* em gorduras brancas que ocorrem durante as dietas cetogênicas.

De fato, os próprios corpos cetônicos, elementos circulantes mais notáveis durante a cetogênese, já foram demonstrados como metabólitos ativadores do *browning*, particularmente o β HB, capaz de diretamente induzir a expressão do gene *Ucp1* e *Cidea* em adipócitos cultivados (Carriere et al., 2014). No entanto, as concentrações testadas de β HB foram suprafisiológicas ou encontradas apenas durante a cetoacidose (15 - 50 mM), enquanto os efeitos das concentrações fisiológicas permanecem desconhecidos.

Restrição calórica, dietas cetogênicas, jejum e exercício físico, são exemplos de situações em que a cetogênese é ativada e a cetose pode ser encontrada sem problemas relacionados à cetoacidose (Meidenbauer et al., 2014; Cahil, 2006). Por isso, uma vez que o estado de cetose pode ser provocado *in vivo* através de intervenções dietéticas, os efeitos das concentrações fisiológicas de corpos cetônicos nos adipócitos são importantes conhecimentos ausentes. Por essa razão, estudamos os efeitos de concentrações fisiológicas de β HB no metabolismo e marcadores de *browning* em adipócitos brancos e tecidos adiposos, *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

Alp PR, Newsholme EA, Zammit VA. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J*. 1976;154:689-700.

Asano H, Kanamori Y, Higurashi S, et al. Induction of beige-like adipocytes in 3T3-L1 cells. *J Vet Med Sci*. 2014;76:57-64.

Astrup A, Bülow J, Madsen J, Christensen NJ. Contribution of BAT and skeletal muscle to thermogenesis induced by ephedrine in man. *Am J Physiol*. 1985;248:E507-15.

Baboota RK, Singh DP, Sarma SM, et al. Capsaicin induces "brite" phenotype in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *PLoS One* 2014; 9:e103093.

Badman MK, Koester A, Flier JS, et al. Fibroblast growth factor 21-deficient mice demonstrate impaired adaptation to ketosis. *Endocrinology*. 2009;150:4931-40.

Barneda D, Planas-Iglesias J, Gaspar ML et al. The brown adipocyte protein CIDEA promotes lipid droplet fusion via a phosphatidic acid-binding amphipathic helix. *Elife*. 2015;4:e07485.

Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10:24-36.

Bielohuby M, Menhofer D, Kirchner H, et al. Induction of ketosis in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets depends on the relative abundance of dietary fat and protein. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300:E65-76.

Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, et al. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest*. 2012;122:1022-36.

Cahill GF Jr Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr* 2006;26:1-22.

Caminhotto RO, Komino ACM, de Fatima Silva F, et al. Oral β -hydroxybutyrate increases ketonemia, decreases visceral adipocyte volume and improves serum lipid profile in Wistar rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2017;14:31.

Cañas N, Sanchis D, Gómez G, et al. 3-Hydroxybutyrate co-infused with noradrenaline decreases resulting plasma levels of noradrenaline in Wistar rats. *J Exp Biol*. 1997;200:2641-6.

Cao W, Medvedev AV, Daniel KW, et al. beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *J Biol Chem*. 200;276:27077-82.

Carrière A, Jeanson Y, Berger-Müller S, et al. Browning of white adipose cells by intermediate metabolites: an adaptive mechanism to alleviate redox pressure. *Diabetes*. 2014;63:3253-65.

Civitarese AE, Carling S, Heilbronn LK, et al. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med*. 2007;4:e76.

Cohen P, Levy JD, Zhang Y, et al. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell* 2014;156:304-16.

Dallan BW, Parker BA, Hodson AE, et al. Insulin selectively reduces mitochondrial uncoupling in brown adipose tissue in mice. *Biochem J*. 2018;475:561-569.

Douris N, Desai BN, Fisher FM, et al. Beta-adrenergic receptors are critical for weight loss but not for other metabolic adaptations to the consumption of a ketogenic diet in male mice. *Mol Metab* 2017;6:854-62.

Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*. 2012;151:400-13.

Feller DD. Metabolism of adipose tissue. I. Incorporation of acetate carbon into lipids by slices of adipose tissue. *J Biol Chem*. 1954;206:171-80.

Fisher FM, Kleiner S, Douris N, et al. FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev*. 2012 Feb 1;26(3):271-81. Suppl Figures.

Gao Z, Yin J, Zhang J, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*. 2009 Jul;58(7):1509-17.

Guerra C, Koza RA, Yamashita H, et al. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest*. 1998;102:412-20.

Hall KD, Chen KY, Guo J, et al. Energy expenditure and body composition changes after an isocaloric ketogenic diet in overweight and obese men. *Am J Clin Nutr*. 2016;104:324-33.

Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 2013; 19: 1252–1263.

Harms MJ, Ishibashi J, Wang W, et al. Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metab*. 2014;19:593-604.

Kajimura S. Promoting brown and beige adipocyte biogenesis through the PRDM16 pathway. *Int J Obes Suppl*. 2015;5(Suppl 1):S11-4.

Kennedy AR, Pissios P, Otu H, et al. A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292:E1724-39

Kesl SL, Poff AM, Ward NP, et al. Effects of exogenous ketone supplementation on blood ketone, glucose, triglyceride, and lipoprotein levels in Sprague-Dawley rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2016;13:9.

Li Z, Yi CX, Katiraei S, et al. Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit. *Gut*. 2018;67:1269-79.

Meidenbauer JJ, Ta N, Seyfried TN. Influence of a ketogenic diet, fish-oil, and calorie restriction on plasma metabolites and lipids in C57BL/6J mice. *Nutr Metab (Lond)*. 2014;11:23.

Müller MJ, Enderle J, Bosy-Westphal A. Changes in energy expenditure with weight gain and weight loss in humans. *Curr Obes Rep*. 2016;5:413-23.

Newman JC, Verdin E. Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25:42-52.

Newman JC, Verdin E. β -Hydroxybutyrate: A Signaling Metabolite. *Annual Review of Nutrition*. 2017;37. 51–76.

Pawan GL, Semple SJ. Effect of 3-hydroxybutyrate in obese subjects on very-low-energy diets and during therapeutic starvation. *Lancet*. 1983;1:15-7.

Pereira MP, Ferreira LAA, da Silva FHS, et al. A low-protein, high-carbohydrate diet increases browning in perirenal adipose tissue but not in inguinal adipose tissue. *Nutrition*. 2017;42:37-45.

Piao Z, Zhai B, Jiang X, et al. Reduced adiposity by compensatory WAT browning upon iBAT removal in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 501:807-813.

Plaisance EP, Lukasova M, Offermanns S, et al. Niacin stimulates adiponectin secretion through the GPR109A receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296:E549-58.

Rachid TL, Penna-de-Carvalho A, Brighenti I, et al. Fenofibrate (PPAR α agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice. *Mol Cell Endocrinol* 2015;402:86-94.

Rojas-Morales P, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. β -Hydroxybutyrate: A signaling metabolite in starvation response? *Cell Signal*. 2016;28:917-23.

Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA, et al. Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:15364-9.

Rothwell NJ, Stock MJ. Luxuskonsumtion, diet-induced thermogenesis and brown fat: the case in favour. Clin Sci (Lond). 1983;64:19-23.

Sanchez-Gurmaches J, Hung CM, Sparks CA, Tang Y, Li H, Guertin DA. PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. Cell Metab 2012; 16: 348–362.

Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. Biochim Biophys Acta. 2011;1813:1269-78.

Sidossis LS, Porter C, Saraf MK, et al. Browning of Subcutaneous White Adipose Tissue in Humans after Severe Adrenergic Stress. Cell Metab 2015;22:219-27.

Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JM, et al. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. Cell Rep 2013;5:1196-203.

Shimazu T, Hirschey MD, Newman J, et al. Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. Science. 2013;339:211-4. Suppl 2

Srivastava S, Baxa U, Niu G, et al. A ketogenic diet increases brown adipose tissue mitochondrial proteins and UCP1 levels in mice. IUBMB Life 2013;65:58-66.

Srivastava S, Kashiwaya Y, King MT, et al. Mitochondrial biogenesis and increased uncoupling protein 1 in brown adipose tissue of mice fed a ketone ester diet. FASEB J 2012;26:2351-62.

Stubbs BJ, Cox PJ, Evans RD, et al. On the Metabolism of Exogenous Ketones in Humans. Front Physiol. 2017;8:848.

Taggart AK, Kero J, Gan X, et al. (D)-beta-Hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. J Biol Chem. 2005;280:26649-52.

Tunaru S, Kero J, Schaub A, et al. PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. Nat Med. 2003;9:352-5.

Wang W, Seale P. Control of brown and beige fat development. Nat Rev Mol Cell Biol. 2016;17:691-702.

Veech RL, Chance B, Kashiwaya Y, et al. Ketone bodies, potential therapeutic uses. IUBMB Life. 2001;51:241-7.

Wu J, Boström P, Sparks LM, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. Cell 2012;150:366-76.

Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev* 2013; 27: 234–250

Yancy WS, Olsen MK, Guyton JR, Bakst RP, Westman EC. A low-carbohydrate, ketogenic diet versus a low-fat diet to treat obesity and hyperlipidemia: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*. 2004;140:769-77.

Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem* 2012;425:88-90.