

O Produto de Acumulação Lipídica está Associado a um Perfil Aterogênico de Lipoproteínas em Indivíduos Brasileiros?

Is Lipid Accumulation Product Associated with an Atherogenic Lipoprotein Profile in Brazilian Subjects?

Flavia De Conti Cartolano,¹ Caroline Pappiani,¹ Maria Camila Prupper de Freitas,¹ Antonio M. Figueiredo Neto,² Antônio Augusto Ferreira Carioca,¹ Nágila Raquel Teixeira Damasceno¹

Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo,¹ São Paulo, SP - Brasil

Instituto de Física da Universidade de São Paulo,² São Paulo, SP - Brasil

Resumo

Fundamento: O produto de acumulação lipídica (LAP), um instrumento simples e de baixo custo, é um novo biomarcador de acúmulo de gordura central e representa um marcador substituto potencial para o perfil aterogênico de lipoproteínas. No entanto, sua associação com subfrações de lipoproteínas ainda não foi descrita na literatura.

Objetivo: Determinar se o LAP pode ser usado como um marcador de tamanho da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e de alta densidade (HDL) em indivíduos brasileiros.

Métodos: Este estudo transversal incluiu 351 pacientes de ambos os sexos e idade entre 30 e 74 anos. Dados clínicos e sociodemográficos e história familiar de doenças foram avaliados. O tamanho das lipoproteínas, e níveis de colesterol total (CT), lipoproteínas, apolipoproteína AI e B (APO AI/APO B), glicose, ácidos graxos não esterificados (AGNEs) e insulina, e índice de resistência insulínica (HOMA-IR) foram avaliados em amostras de sangue. O LAP foi calculado utilizando-se as fórmulas (circunferência da cintura_[cm]-58) × (triglicerídeos_[mmol/L]) para mulheres e (circunferência da cintura_[cm]-65) × (triglicerídeos_[mmol/L]) para homens. Associações entre LAP e parâmetros metabólicos foram testadas por tendência linear (modelo linear generalizado, GLM) antes e após ajustes por fatores de confusão (sexo, idade, tabagismo, uso de estatinas, fibratos e hipoglicemiantes) ao nível de significância de $p < 0,05$.

Resultados: LAP apresentou uma associação positiva com CT, APO B, AGNEs, glicose, insulina, HOMA-IR, e uma associação negativa com HDL-C. Maior acúmulo de gordura central correlacionou-se com maior porcentagem de HDL intermediária e de partículas pequenas de LDL e HDL, e menor porcentagem de HDL grande. O tamanho da LDL também era reduzido em valores de LAP mais elevados. O impacto negativo do LAP foi mantido após ajuste para múltiplas variáveis.

Conclusão: o LAP esteve fortemente associado com o perfil aterogênico de subfrações de lipoproteínas, independentemente dos fatores de confusão. (Arq Bras Cardiol. 2018; 110(4):339-347)

Palavras-chave: Doenças Cardiovasculares; Lipoproteínas HDL; Lipoproteínas LDL; Resistência à Insulina; Dislipidemias; Adultos; Fatores de Risco.

Abstract

Background: Lipid accumulation product (LAP), a simple and low-cost tool, is a novel biomarker of central lipid accumulation and represents a potential surrogate marker for atherogenic lipoprotein profile. However, its association with lipoprotein subfractions has not been described in the literature.

Objective: To determine whether LAP index could be used as a marker of low- and high-density lipoprotein (LDL and HDL) size in Brazilian individuals.

Methods: This cross-sectional study included patients ($n = 351$) of both sexes and age between 30-74 years. Clinical and sociodemographic data and family history of diseases were evaluated. Lipoprotein size, and levels of total cholesterol (TC), lipoproteins, apolipoprotein AI and B (APO AI/APO B), glucose, insulin, insulin resistance index (HOMA-IR) and non-esterified fatty acids (NEFA) were assessed in blood samples. LAP was calculated by the formulas [(waist circumference_[cm]-58) × (triglycerides_[mmol/L]) for women and (waist circumference_[cm]-65) × (triglycerides_[mmol/L]) for men]. The association between LAP and metabolic parameters were tested by linear trend (general linear model, GLM test) before and after multiple adjustments for potential confounders (sex, age, smoking, statin, fibrate, and hypoglycemic drugs) at significant level $p < 0.05$.

Results: LAP was positively associated with TC, APO B, NEFA, glucose, insulin and HOMA-IR values, and negatively associated with HDL-C. Higher central lipid accumulation was correlated with higher percentage of intermediate HDL and of small LDL and HDL and less amount of large HDL. LDL size was also reduced in greater LAP index values. The negative impact of LAP was maintained after adjustment for multiple variables.

Conclusion: LAP was robustly associated with atherogenic profile of lipoprotein subfractions, independently of multiple confounders. (Arq Bras Cardiol. 2018; 110(4):339-347)

Keywords: Cardiovascular Diseases; Lipoproteins, HDL; Lipoproteins, LDL; Insulin Resistance; Dyslipidemias; Adults; Risk Factors.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Nágila Raquel Teixeira Damasceno •

Faculdade de Saúde Pública. Avenida Doutor Arnaldo, 715. CEP 01246-904. São Paulo, SP - Brasil

E-mail: nagila@usp.br

Artigo recebido em 21/03/2017, revisado em 18/09/2017, aceito em 09/11/2017

DOI: 10.5935/abc.20180054

Introdução

A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de morbidade e de mortalidade prematura no mundo, comprometendo significativos recursos privados e públicos.¹ Programas de políticas públicas são focados na prevenção e na modificação de fatores de risco tradicionais (hipertensão, dislipidemia, tabagismo e diabetes mellitus), os quais são a base de todos os modelos de predição de risco cardiovascular. No entanto, a identificação de novos fatores de risco e/ou marcadores para DCV é importante para melhor compreensão de alguns eventos clínicos que não podem ser explicados pelos fatores de risco clássicos.

Novos biomarcadores envolvem parâmetros bioquímicos mensuráveis no soro ou no plasma. Contudo, o colesterol associado à lipoproteína de alta densidade (HDL-C) e o colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) ainda são as principais lipoproteínas monitoradas para estimar o risco cardiovascular em adultos.² Atualmente, biomarcadores associados com funcionalidade e estrutura das lipoproteínas – tal como seu tamanho (pequeno, intermediário, grande, e fenótipos A e B) – antioxidantes (tocoferol, carotenoides), apolipoproteínas (Apo B, AI, CII, J, F) e enzimas (Lp-PLA₂, ACAT) têm sido estudados.³⁻⁵ Particularmente, partículas pequenas e densas de LDL têm sido amplamente descritas por suas propriedades pró-aterogênicas. Essa partícula migra para o espaço subendotelial mais facilmente, recruta e ativa macrófagos, causando sua transformação em células espumosas e gerando estrias gordurosas, uma marca da aterosclerose.⁴ Ao contrário dos mecanismos aterogênicos bem estabelecidos do LDL, o papel funcional do tamanho do HDL ainda é controverso. Partículas pequenas de HDL são descritas como mais antioxidantes, anti-inflamatórias e com maior capacidade de promover a saída de colesterol das células.⁶ Por outro lado, Woudberg et al.⁷ mostraram que a obesidade esteve associada com diminuição das subclasses de partículas grandes de HDL. Muitos desses biomarcadores são caros, requerem métodos tecnicamente sofisticados e apresentam uso limitado na atenção primária à saúde e na prevenção de doenças.

O Produto da Acumulação Lipídica (LAP) foi proposto como um índice simples, barato e preciso para estimar o risco cardiovascular⁸ e mortalidade por todas as causas.⁹ Esse índice combina parâmetros antropométricos (circunferência da cintura, CC) e bioquímicos (triglicérides de jejum, TG), conectando mudanças anatômicas a mudanças fisiológicas associadas com acúmulo aumentado de gordura corporal em adultos. Kahn,¹⁰ observou no terceiro *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III) o efeito negativo da CC, possivelmente relacionado com partículas pequenas e densas de LDL, embora a medida do tamanho de sua partícula não tenha sido diretamente realizada. A validade e a superioridade do LAP em identificar risco cardiovascular, síndrome metabólica, e resistência insulínica foram comparadas com as do índice de massa corporal (IMC), CC e relação cintura quadril.⁹⁻¹³ Apesar do impacto negativo do LAP no metabolismo de glicose, avaliado principalmente em mulheres pós-menopausa^{13,14} e mulheres com ovário policístico,^{15,16} sua associação com o tamanho das lipoproteínas não foi diretamente avaliada.

Estudos prévios baseados no LAP confirmaram sua associação com fatores de risco clássicos para DCV.¹⁷⁻²⁰

Portanto, o objetivo deste estudo foi expandir o conhecimento existente sobre o LAP, avaliando-se o impacto desse parâmetro sobre o tamanho da LDL e da HDL, considerando a potencial influência de fatores de confusão.

Métodos

Sujeitos

Um total de 351 adultos de ambos os sexos e múltiplos fatores de riscos cardiovasculares foram recrutados para este estudo transversal após completa avaliação clínica e eletrocardiograma (ECG). Esses indivíduos foram recrutados do centro de pesquisa localizado no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Utilizamos o método de amostragem não probabilística. De acordo com os critérios de inclusão, os indivíduos incluídos tinham idade entre 30 e 74 anos, e um ou mais fatores de risco para DCV – dislipidemia, diabetes mellitus e/ou hipertensão. Gestantes, lactantes, indivíduos que participaram em outros estudos, que apresentavam doença renal ou hepática grave, diabetes mellitus tipo 1, usuários de drogas ilícitas, alcoólatras ou em uso de hipolipemiantes introduzidos ou trocados 30 dias antes da coleta de sangue não foram incluídos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do hospital (número 1126/11) e da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (número 2264), e todos os procedimentos foram realizados segundo padrões da Declaração de Helsinque (1975, revisada em 2008). Todos os participantes deram seu consentimento informado por escrito.

Perfil clínico-demográfico

Entrevistadores treinados avaliaram as características demográficas dos participantes utilizando um questionário pré-estruturado que abordava sexo, idade e etnia. A avaliação clínica consistiu em obtenção de dados atuais sobre história médica, história familiar (pai e mãe) de doenças crônicas, e uso regular de medicamentos. Tabagismo foi considerado quando relatado pelos indivíduos, independentemente da quantidade de cigarros. Hipertensão foi confirmada por história clínica, uso de medicamentos anti-hipertensivos e pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) monitoradas após pelo menos cinco minutos em repouso, sendo que a média de três medidas foi usada para análise. Hipertensão foi definida como PAS \geq 140 mmHg e/ou PAD \geq 90 mmHg. Diabetes tipo 2 foi definido por diagnóstico prévio de diabetes, uso de hipoglicemiantes e níveis plasmáticos de glicose acima de 100 mg/dL. O score de risco de Framingham (ERF) foi calculado conforme descrito anteriormente.^{21,22}

Parâmetros antropométricos

Peso (Kg) e altura (cm) foram medidos com precisão de 0,1 Kg e 0,1 cm, respectivamente, utilizando-se métodos e instrumentos padronizados. O IMC foi calculado como o peso (Kg) dividido pela altura ao quadrado (m²). A CC foi medida usando-se uma fita inelástica de 1,0 mm de precisão (TBW®; São Paulo, SP, Brasil), sem pressioná-la contra o corpo. A composição corporal foi avaliada por impedância bioelétrica (BIA) (Analyzer®, model Quantum II; RJL Systems; Michigan, USA). A porcentagem de gordura

corporal foi calculada pelo programa Cyprus (Composition Analysis System, v. 2.5; RJI Systems®; Detroit, MI, EUA), que considerou sexo, idade, peso, altura, atividade física, resistência e reatância. Todas as medidas foram realizadas em duplicata por uma equipe treinada.

Amostras de sangue

Após jejum de 12 horas, foram coletadas amostras (20 mL) de sangue. Para análises a partir do plasma, o sangue foi coletado em tubos Vacutainer contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; 1,0 µg/mL). Os inibidores de protease aprotinina (10,0 µg/mL), benzamidina (10,0 µM), e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF; 5,0 µM) com o antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT; 100,0 µM) foram adicionados às amostras. O plasma e o soro foram separados por centrifugação (3000 rpm; 10 minutos; 4°C) e as amostras foram mantidas congeladas (-80°C) até serem analisadas.

Análise bioquímica

Níveis plasmáticos de TG, colesterol total (CT) e HDL-C foram medidos usando-se kits comerciais (Labtest; Lagoa Santa, MG, Brasil). Concentrações de LDL-C foram calculadas usando a equação de Friedewald para indivíduos com TG menor de 400 mg/dL.²³ Apolipoproteínas B e AI (Apo B e Apo AI) foram determinadas por métodos padrões (APO A1 e APO B Autokits, Randox; Kearneysville, WV, EUA). Ácidos graxos não esterificados (AGNEs) foram determinados utilizando o kit Free Fatty Acid Quantification (Wako Chemicals – USA Inc.; Richmond, VA, EUA). A resistência insulínica foi calculada pelo HOMA-IR (homeostasis model assessment-insulin resistance): $HOMA-IR = \text{insulina de jejum (U/mL)} \times \text{glicose de jejum (mmol/L)} / 22,5$.²⁴ Esses parâmetros foram analisados em duplicata pelo sistema automático Cobas (Hitachi High Technology, Minato-ku, Tóquio, Japão).

A distribuição das subfrações de HDL e de LDL foi determinada pelo sistema Lipoprint baseado em gel de poliácridamida não desnaturante. As sub-frações LDL1 e LDL2 foram classificadas como LDL grande, e as sub-frações LDL3 a LDL7 foram classificadas como partículas menores, de maior densidade. O tamanho do LDL (nm) foi determinado e, a partir dele, foram calculados os padrões fenotípicos A (LDL grande, > 25,6 nm, e menos densa) e não A (LDL pequena, ≤ 25,6 nm, e densa). Para o tamanho da partícula de HDL, foram identificadas dez sub-frações, as quais foram classificadas em partículas grandes (HDL 1 ao HDL 3), intermediário (HDL 4 ao HDL 7), e pequena (HDL 8 ao HDL10).

Todas as análises foram realizadas em duplicata e os coeficientes de variância entre (1-5,8%) e intratestes (0,5-15%) foram calculados.

Produto de Acumulação Lipídica (LAP)

O LAP foi calculado utilizando-se diferentes fórmulas para mulheres ($CC_{[cm]} - 58$) \times (TG_[mmol/L]) e homens ($CC_{[cm]} - 65$) \times (TG_[mmol/L]), que incluíram os valores mínimos de CC específicos para cada sexo.⁸

Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS®; v. 20.0). Valores de $p < 0,05$ bicaudais foram considerados estatisticamente significativos. O teste de Kolmogorov-Smirnov ($p > 0,05$) foi usado para avaliar a normalidade dos dados. Variáveis contínuas com distribuição normal foram apresentadas em média e desvio padrão (DP), ao passo que os dados com distribuição não normal foram apresentados como mediana e percentis 25 e 75. As variáveis categóricas foram apresentadas em valores absolutos (n) e porcentagens (%). Dados com distribuição normal foram comparados entre os grupos pelo teste t de Student não pareado, e dados sem distribuição normal foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Variáveis categóricas foram comparadas pelo teste qui-quadrado de Pearson ou pelo teste exato de Fisher. Os indivíduos foram divididos em tercios do LAP e o perfil de lipoproteínas aterogênicas foi testado em um teste de tendência linear por modelos ajustados e não ajustados: idade e sexo (Modelo A) e idade, sexo, tabagismo, uso de estatina, fibrato, e/ou drogas hipoglicemiantes (Modelo B). Além disso, comparação entre grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis) – com comparações múltiplas pelo teste de Tukey) após todos os ajustes (Modelo B) com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$.

Resultados

As características clínicas dos 351 indivíduos agrupados por sexo são apresentadas na Tabela 1. A idade média dos indivíduos foi de 49,4 anos para homens (30–72 anos) e de 54,4 anos para mulheres (30–74 anos, $p < 0,001$). As mulheres eram mais velhas e relataram maior uso de medicamentos que os homens (83,6 versus 69,8, respectivamente, $p = 0,001$), enquanto uma maior porcentagem de fumantes foi encontrada entre os homens ($p = 0,026$). Mais de 80% dos indivíduos apresentaram doença prévia no momento do rastreamento. A hipertensão foi a doença mais prevalente em ambos os gêneros (56,9% em homens e 57,1% em mulheres), o que foi corroborado pela alta porcentagem de usuários de drogas anti-hipertensivas. Esse perfil esteve em concordância com a alta frequência de hipertensão no pai e/ou na mãe dos pais (62,9% nos homens e 66,2% nas mulheres).

A Tabela 2 apresenta resultados do risco cardiovascular, avaliado pelo ERF, e das variáveis bioquímicas e antropométricas estratificadas por sexo. O ERF foi similar entre homens (13,6 pontos) e mulheres (13,5 pontos), indicando um risco cardiovascular moderado em ambos os grupos. Os homens apresentaram valores mais altos de CC e TG, com impacto direto sobre valores elevados de LAP em comparação às mulheres. Por outro lado, as mulheres apresentaram valores superiores de Apo AI, HDL-C e AGNEs. Ambos os grupos mostraram perfis similares de IMC e homeostase da glicose avaliada pela glicemia, insulina e HOMA-IR. A influência do gênero sobre o metabolismo de lipídios foi confirmada pela elevada porcentagem de partículas pequenas de HDL e de LDL, e porcentagem reduzida de partículas grandes de HDL

Tabela 1 – Características clínicas e demográficas dos indivíduos por sexo

Variáveis	Total (n = 351)		Homens (n = 132)		Mulheres (n = 219)		p
	n	%	n	%	n	%	
Idade (anos) **	52,5	(10,4)	49,4	(11,1)	54,4	(9,6)	< 0,001
Tabagismo Não	282	80,3	98	74,2	184	84,0	0,026
Doenças atuais	306	87,2	114	86,4	192	87,7	0,723
Diabetes mellitus	71	20,2	32	24,2	39	17,8	0,146
Hipertensão	200	57,0	75	56,8	125	57,1	0,962
Dislipidemia	192	54,7	72	54,5	120	54,8	0,964
Medicamentos	274	78,1	91	69,8	183	83,6	0,001
Estatinas	98	27,9	28	21,2	70	32,0	0,030
Anti-hipertensivos	181	51,6	64	48,5	117	53,2	0,370
Hipoglicemiantes	73	20,8	29	22,0	44	20,1	0,674
Fibratos [§]	9	2,6	3	2,3	6	2,7	0,543
História familiar de doenças	320	91,2	122	92,4	198	90,4	0,520
Obesidade	64	18,2	28	21,2	36	16,4	0,262
Hipertensão	228	65,0	83	62,9	145	66,2	0,526
Infarto agudo do miocárdio	100	28,5	38	28,8	62	28,3	0,924
Acidente vascular cerebral	67	19,1	25	18,9	42	19,2	0,956
Diabetes mellitus	134	38,2	49	37,1	85	38,8	0,752
Doença vascular periférica	25	7,1	8	6,1	17	7,8	0,548

Análise comparativa das variáveis categóricas realizada pelo teste qui-quadrado de Pearson ou o teste exato de Fisher (§) ($p < 0,05$). ** Dados apresentados em média e desvio padrão. Análise comparativa das variáveis contínuas foi realizada pelo teste t de Student não pareado ($p < 0,05$)

em homens. Esse perfil foi reforçado pelos níveis mais altos de LDL com o aumento do tamanho do LDL em homens (26,9 em homens versus 27,0 em mulheres, $p = 0,001$) e de fenótipo A em mulheres (52,3% em homens versus 70,8% em mulheres; $p = 0,001$).

Associações ajustadas e não ajustadas (dados brutos) entre LAP e outros parâmetros foram testadas por tercís (Tabela 3). O LAP foi positivamente associado com CT, Apo B, AGNEs, glicose, insulina, e HOMA-IR e, conseqüentemente, essa associação aumentou com a pontuação do ERF. Surpreendentemente, não houve associação entre LAP e LDL-C. Após vários ajustes quanto a potenciais fatores de confusão (modelos A e B), as associações entre LAP e parâmetros bioquímicos foram mantidos, exceto para Apo AI.

Além disso, observou-se uma associação positiva entre o acúmulo de gordura central e a porcentagem de subfrações de HDL intermediárias e pequenas tanto na amostra total (Figura 1A) como na amostra estratificada por sexo (Figura 1B, 1C) após ajuste por idade, tabagismo e uso de estatina, fibrato e hipoglicemiantes. Resultados similares foram observados para subfração de LDL pequena, isto é, indivíduos nos tercís mais baixo, no meio e mais alto apresentaram, respectivamente, 1,5%, 2,3% e 7,5% de LDL pequena ($p < 0,001$) (Figura 2Aii). Diferenças maiores foram observadas nos homens (Figura 1Bi).

O tamanho da LDL e a porcentagem de HDL grande estiveram negativamente associados com LAP. Na amostra

total, essa diferença foi de aproximadamente 10 pontos para HDL grande – 34,2% em T1 e 24,5% em T3 (Figuras 1Ai, Bi, Ci). Associações entre LAP e LDL grande foram observadas entre os homens (Figura 2Bi), mas não na amostra total ou nas mulheres, o que demonstra uma relação sexo-dependente para essa subfração.

Discussão

Com base neste estudo transversal, o LAP está significativamente associado tanto com biomarcadores cardiovasculares clássicos como novos. Essas associações foram particularmente importantes quando o LAP foi correlacionado com o tamanho das partículas de LDL e HDL.

Em um estudo prévio, Kahn & Valdez,⁸ avaliaram uma amostra transversal do NHANES III e relataram que indivíduos com CC e TG elevados eram mais propensos a apresentar níveis elevados de HDL-C, Apo B, insulina e glicose. Posteriormente, Kahn,¹¹ confirmou que o LAP foi superior que o IMC para identificar adultos com diabetes mellitus e predizer desequilíbrio nas variáveis glicometabólicas (HOMA-IR, glicose de jejum, e hemoglobina glicada). Resultados similares foram encontrados em estudos conduzidos em outros países, nos quais LAP foi um melhor marcador de desequilíbrio da glicose e um melhor preditor de diabetes que o IMC.¹³⁻²⁰ O presente estudo confirma que o LAP é sensível para identificar disfunções relacionadas ao metabolismo da glicose, mesmo após ajuste para uso de medicamentos e fatores de confusão.

Tabela 2 – Escore de risco Framingham, características bioquímicas e antropométricas dos indivíduos segundo o sexo

Variáveis	Total (n = 351)	Homens (n = 132)	Mulheres (n = 219)	p
ERF (pontos)	13,5 (4,8)	13,6 (5,0)	13,5 (4,5)	0,941
HDL-C (mg/dl)	37,0 (10,0)	32,0 (7,0)	40,0 (10,0)	< 0,001
LDL-C (mg/dl)	139,0 (38,0)	133,0 (22,0)	41,0 (40,0)	0,092
TG (mg/dl)*	128,0 (94,0 - 188,0)	145,0 (10,06 - 213,0)	121,0 (90,0 - 172,0)	0,001
Apo AI (mg/dl)	132,0 (25,0)	123,0 (33,0)	137,0 (26,0)	< 0,001
Apo B (mg/dl)	104,0 (25,0)	103,0 (23,0)	105,0 (26,0)	0,400
AGNEs (mEq/dl)	0,6 (0,3)	0,6 (0,3)	0,7 (0,3)	0,016
LDL pequena (%)*	1,6 (0,8 - 4,5)	2,1 (1,0 - 6,3)	1,4 (0,6 - 3,6)	0,003
LDL grande (%)	26,3 (5,4)	26,6 (4,9)	26,1 (5,6)	0,491
HDL pequena (%)	19,8 (7,1)	21,1 (6,5)	19,1 (7,4)	0,022
HDL intermediária (%)	50,3 (5,1)	51,1 (4,5)	49,8 (5,3)	0,039
HDL grande (%)	29,9 (8,6)	27,8 (7,8)	31,0 (8,8)	0,002
Tamanho da LDL* (nm)	27,0 (26,5 - 27,2)	26,9 (26,4 - 27,1)	27,0 (26,7 - 27,2)	0,001
Fenótipo A (%) **	63,8	52,3	70,8	0,001
Glicose (mg/dl)*	97 (91,0 - 108,0)	98 (91,0 - 113,0)	97 (91,0 - 105,0)	0,358
Insulina (µIU/ml)*	16,3 (12,6 - 22,1)	15,6 (12,7 - 22,5)	16,7 (12,4 - 22,0)	0,791
HOMA-IR *	4,0 (2,9 - 5,9)	4,2 (3,1 - 5,9)	4,0 (2,9 - 5,8)	0,596
Peso (kg)	77,9 (68,8 - 93,9)	89,7 (75,8 - 101,7)	72,9 (64,1 - 86,5)	<0,001
CC (cm)	100,5 (13,5)	104,2 (12,7)	98,4 (13,5)	<0,001
Gordura corporal (%)	37,8 (25,2 - 46,0)	23,4 (20,7 - 26,9)	43,4 (38,4 - 49,2)	<0,001
IMC (kg/m ²)	30,8 (5,9)	30,6 (5,4)	30,9 (6,2)	0,628
LAP *	57,7 (35,4 - 87,2)	68,4 (40,5 - 105,0)	53,2 (35,2 - 81,6)	0,026

Dados apresentados em média (desvio padrão) e mediana (p25-p75). Análise comparativa realizada pelo teste t de Student não pareado ou o teste de Mann-Whitney (*) e qui-quadrado de Pearson (**) (p < 0,05). ERF: escore de risco Framingham, CT: colesterol total, HDL-C: colesterol associado à lipoproteína de alta densidade, LDL-C: colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade, TG: triglicerídeos, Apo AI: apolipoproteína AI, Apo B: apolipoproteína B, AGNEs: ácidos graxos não esterificados, IMC: índice de massa corporal, LAP: produto de acumulação lipídica, CC: circunferência da cintura

Tabela 3 – Análise de tendência linear do escore de risco Framingham e variáveis bioquímicas nos tercís do produto de acumulação lipídica

	LAP			Dados brutos	Modelo A	Modelo B
	T1 ≤ 45,5 (n = 117)	45,5 < T2 ≤ 80,3 (n = 117)	T3 > 80,3 (n = 117)	p	p	p
FRS score	12,3	13,6	14,6 [§]	< 0,001	< 0,001	< 0,001
CT (mg/dl)	198,2	201,0	216,0 [§]	0,001	< 0,001	< 0,001
HDL-C (mg/dl)	40,7	37,6	32,4 [§]	< 0,001	< 0,001	< 0,001
LDL-C (mg/dl)	139,6	136,1	136,2	0,514	0,660	0,770
Apo AI (mg/dl)	135,6	134,2	127,2	0,012	0,062	0,073
Apo B (mg/dl)	97,5	103,8 [†]	111,9 [§]	< 0,001	< 0,001	< 0,001
AGNEs (mEq/dl)	0,6	0,6	0,7 [†]	0,012	0,002	0,006
Glicose (mg/dl)	96,4	101,8	122,1 [§]	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Insulina (µIU/ml)	15,1	19,0 [†]	21,0 [†]	< 0,001	< 0,001	< 0,001
HOMA-IR	3,6	4,7	6,2 [§]	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Modelo A: ajustado por sexo e idade. Modelo B: ajustado por sexo, idade, tabagismo, uso de estatina, fibrato, e hipoglicemiantes e drogas hipoglicemiantes. ERF: Escore de risco Framingham; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol associado à lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade; Apo AI: apolipoproteína AI; Apo B: polipoproteína B; AGNEs: ácidos graxos não esterificados; LAP: produto de acumulação lipídica. Comparação entre grupos realizado pelo teste ANOVA ou Kruskal-Wallis, e comparações múltiplas pelo teste de Tukey. [†]versus T1, [§]versus T2. Nível de significância adotado de p < 0,05 para todas as análises.

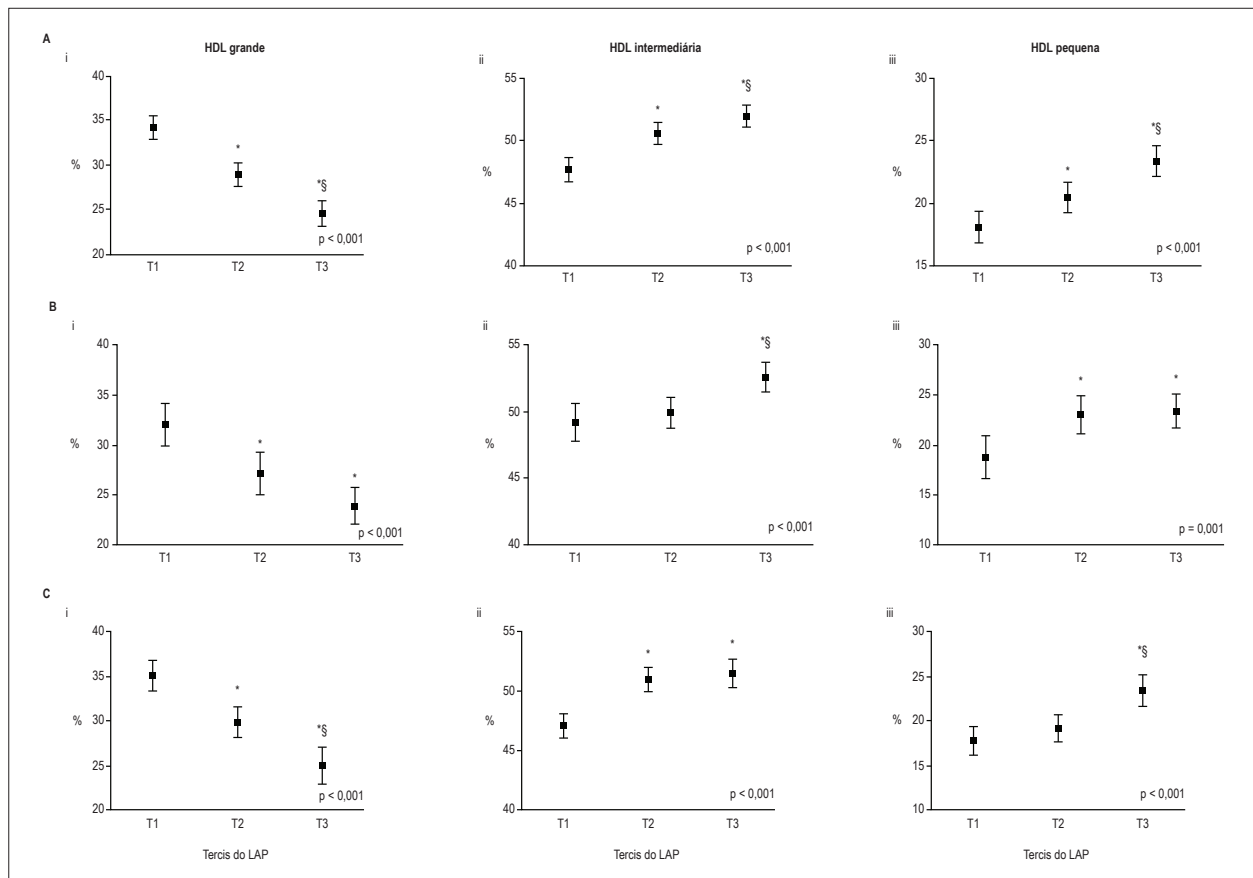


Figura 1 – Porcentagens de partículas de HDL (lipoproteína de alta densidade), de acordo com tercís de LAP (produto de acumulação lipídica). A) ajustado por sexo, idade, tabagismo, uso de fibratos e hipoglicemiantes. B) Homens, ajustado por idade, tabagismo, uso de estatina, fibrato, e drogas hipoglicemiantes (n = 132). C) Mulheres, ajustado por idade, tabagismo, uso de estatina, fibrato, e drogas hipoglicemiantes (n = 219). i: HDL grande. ii: HDL intermediária. iii: HDL pequena. Dados apresentados em média e intervalo de confiança de 95%. Análise comparativa realizada pelo teste de tendência linear. Tercís de LAP: T1 ≤ 45,5; 45,5 < T2 ≤ 80,3; T3 > 80,3. % - porcentagem. Comparação entre grupos realizada por ANOVA ou Kruskal-Wallis e comparações múltiplas pelo teste de Tukey. *versus T1, §versus T2. Nível de significância adotado de p < 0,05 para todas as análises.

A importância do LDL-C no desenvolvimento da aterosclerose já foi reconhecida. No entanto, alguns indivíduos com níveis normais de LDL-C apresentam eventos cardiovasculares, indicando que outros fatores de risco relacionados ou não com LDL exercem um papel no processo aterosclerótico. Evidência epidemiológica mostra que uma proporção aumentada de partículas pequenas e densas de LDL está fortemente associada com o risco de doença coronariana.²⁵ Indivíduos com concentrações plasmáticas elevadas de LDL pequena e densa têm 3 a 7 vezes maior risco de desenvolverem doença arterial coronariana (DAC), independentemente do nível de LDL-C.⁵ Tem sido proposto que subfrações de LDL menores e mais densas, conhecidas como fenótipo B, têm propriedade mais aterogênica que LDL grandes. Partículas menores permanecem por mais tempo no plasma e apresentam afinidade reduzida pelo receptor B/E.²⁵ LDL do fenótipo B é altamente reconhecida por receptores varredores (scavenger) e, portanto, é mais susceptível à migração à camada subendotelial e oxidação.^{4,5} Apesar disso, a relação entre o LAP e o tamanho da LDL não foi descrita na literatura. Nossos resultados mostraram que partículas pequenas de LDL teve uma associação positiva e o tamanho

da partícula uma associação negativa com LAP, mesmo na ausência de correlação entre LDL-C e LAP. Mirmiran et al.,²⁶ também não encontraram relação entre LAP e LDL-C.

Reforçando o papel negativo da LDL pequena e densa, Kwon et al.,²⁷ descreveram que essa partícula associou-se independentemente com a incidência e a extensão de doença arterial coronariana em uma população na Coreia, o que foi confirmado por estudos subsequentes.^{28,29} Outros estudos também relataram uma correlação negativa entre o tamanho da LDL e o risco de infarto agudo do miocárdio.^{30,31} LDL pequena e densa também foi associada com TG aumentado e níveis reduzidos de HDL-C.³² Assim, os resultados apresentados neste estudo mostraram, pela primeira vez, que o LAP foi significativamente e fortemente associado com a partícula pequena, mais aterogênica de LDL em brasileiros com idade superior a 30 anos de idade e risco cardiovascular moderado.

Diferente de LDL-C elevado, um baixo nível de HDL-C é aceito como um fator de risco independente para DCV.^{22,23,32} Atualmente, propõe-se que o transporte reverso do colesterol e outras propriedades do HDL, tais como ação

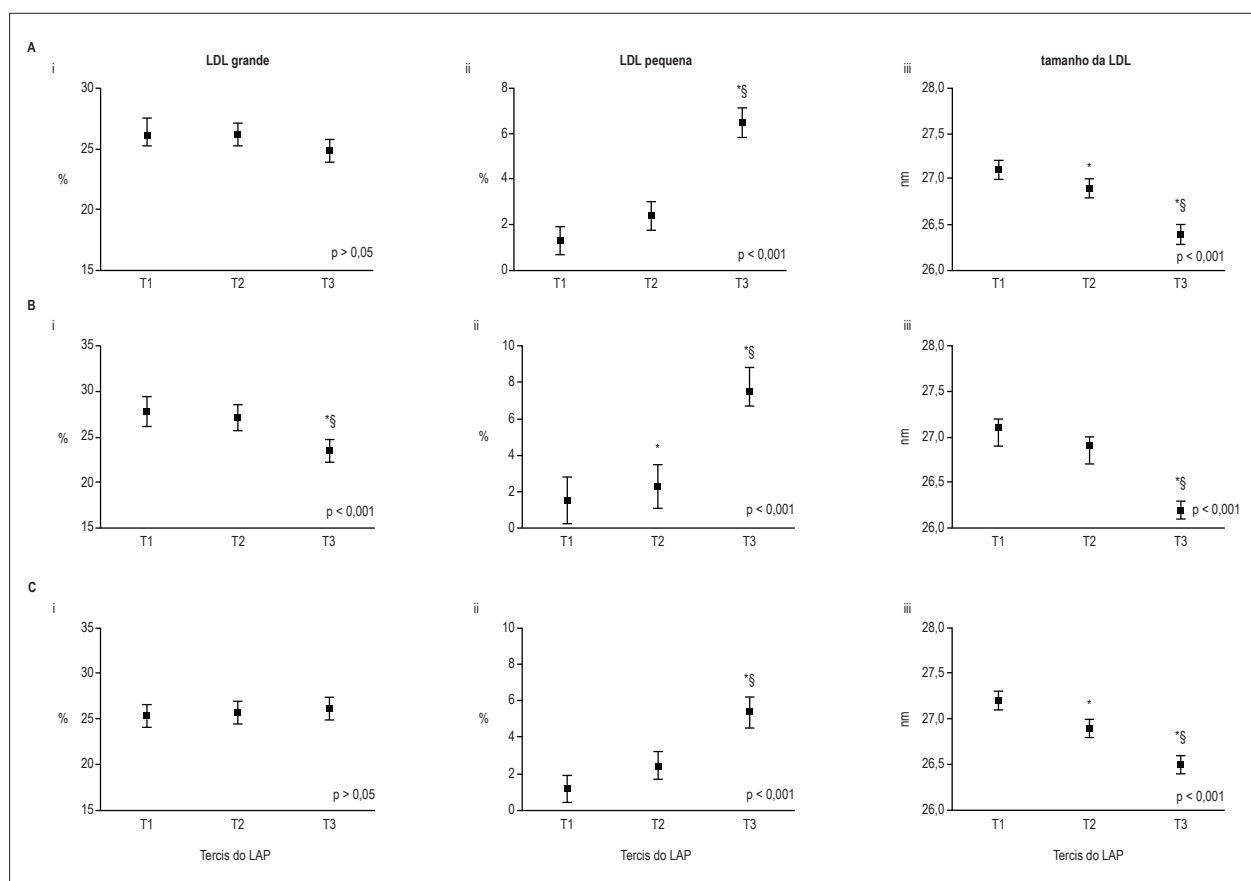


Figura 2 – Percentagens de partículas grandes e pequenas de LDL (lipoproteína de baixa densidade), e do tamanho da partícula de LDL, de acordo com os tercios de LAP (produto de acumulação lipídica). A) ajustado por sexo, idade, tabagismo, uso de fibratos e hipoglicemiantes. B) Homens, ajustado por idade, tabagismo, uso de estatina, fibrato, e drogas hipoglicemiantes (n = 132). C) Mulheres, ajustado por idade, tabagismo, uso de estatina, fibrato, e drogas hipoglicemiantes (n = 219). i: LDL grande. ii: LDL intermediária. iii: LDL pequena. Dados apresentados em média e intervalo de confiança de 95%. Análise comparativa realizada pelo teste de tendência linear. Tercios de LAP: T1 ≤ 45,5; 45,5 < T2 ≤ 80,3; T3 > 80,3. % - porcentagem. Comparação entre grupos realizada por ANOVA ou Kruskal-Wallis e comparações múltiplas pelo teste de Tukey. [†]versus T1, [‡]versus T2. Nível de significância adotado de $p < 0,05$ para todas as análises.

antitrombótica, função endotelial, e atividades antioxidante e anti-inflamatória dependem do tamanho da partícula de HDL.³³ Partículas maiores de HDL possuem um maior teor de Apo A1 e são descritas como mais eficazes no transporte reverso do colesterol.³ Asztalos et al.,³² mostraram que a predominância de partículas pequenas, e não de partículas grandes de HDL, esteve associada com várias características da síndrome metabólica e risco de doença arterial coronariana.³⁴ Nossos resultados mostraram uma relação negativa do LAP e partículas maiores de HD e uma relação positiva com partículas menores de HDL. Esse padrão está de acordo com concentrações aumentadas de HDL-C em indivíduos com LAP mais baixo, apesar de que nenhuma correlação entre LAP e Apo A1 foi encontrada. Juntamente com resultados do LDL, esse fato reforça o papel do LAP como um marcador substituto para as subfrações de lipoproteínas aterogênicas.

Ainda, nossos resultados mostraram uma tendência linear positiva entre valores de AGNEs e de LAP. Estudos epidemiológicos relataram uma associação entre AGNEs e o risco de diabetes mellitus.^{35,36} Concentrações aumentadas de AGNEs em indivíduos com obesidade visceral contribuem para o

desenvolvimento de várias doenças, tais como resistência periférica à insulina, dislipidemia, e apoptose de célula beta.³⁷ Nossos dados mostraram valores de AGNEs similares ou maiores que os encontrados na literatura.^{38,39} Tal fato é compatível com os valores também aumentados encontrados de glicose, insulina e HOMA-IR, independentemente de sexo em nosso estudo. Tendências lineares entre LAP e glicose de jejum, insulina e HOMA-IR confirmam a associação desse index com várias disfunções relacionadas à glicose e disfunções cardiovasculares. Anteriormente, Sambataro et al.,⁴⁰ mostraram que a sensibilidade à insulina não está limitada à disfunção da glicose e insulina de jejum, e que o metabolismo de lipídios pode afetar essa sensibilidade. Portanto, a capacidade do LAP em identificar, simultaneamente, mudanças no metabolismo da glicose e de lipídios pode expandir a relevância clínica desse index.

Este estudo teve algumas limitações. A limitação mais relevante foi o fato de que o estudo foi conduzido somente em indivíduos com pelo menos um fator de risco cardiovascular, isto é, hipertensão, diabetes mellitus ou dislipidemia. Isso sugere que as associações encontradas neste estudo podem não ser válidas para populações saudáveis. Por outro

lado, o diagnóstico precoce de dislipidemia e mudanças no metabolismo da glicose infelizmente são comuns em adultos jovens. Assim, mais indivíduos seriam beneficiados pela inclusão do LAP no rastreamento e no monitoramento do risco cardiovascular. A segunda limitação foi a avaliação de eventos cardiovasculares prévios por meio de dados clínicos e mudanças no ECG. Apesar de se saber que esses dados não refletem necessariamente a ausência de doença coronária, na prática clínica, os indivíduos não são submetidos a exames complementares, como o teste provocativo para se detectar isquemia miocárdica quando a avaliação inicial indica baixo risco cardiovascular. Em protocolos de rastreamento, o ECG, associado a dados clínicos e bioquímicos complementares, é o primeiro instrumento utilizado devido ao seu baixo custo. No entanto, nós admitimos que não se pode excluir doença cardiovascular nesses indivíduos. E terceiro, os indivíduos incluídos neste estudo estavam usando estatina (27,9%) e fibrato (2,6%). Esses medicamentos têm efeito direto e indireto no metabolismo de lipídios, promovendo mudanças no TG, um componente do LAP. Apesar disso, esses indivíduos estavam recebendo o mesmo tratamento medicamentoso (tipo e posologia) por pelo menos 30 dias antes do estudo.

Métodos utilizados para a mensuração de fatores de risco cardiovasculares são geralmente complexos e caros e, por isso, não podem ser usados em estudos de grande escala. O LAP é uma variável cuja mensuração é fácil e de baixo custo, e poderia ser usado para se estabelecer efeitos causais sobre desfechos clínicos. Portanto, espera-se que os resultados positivos de ensaios clínicos e estudos tipo coorte prospectivos possam encorajar a realização de novas abordagens para estimar o risco de DCV.

Conclusões

Nossos resultados mostraram que o LAP associou-se com um perfil lipoproteico aterogênico em indivíduos brasileiros, incluindo CT, HDL-C, Apo B, subfrações pequenas de HDL e de LDL, e tamanho da LDL. É plausível sugerir que o LAP

possa ser um marcador clínico simples e útil para a avaliação de fatores de risco cardiometabólicos.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Cartolano FDC, Freitas MCP, Damasceno NRT; Obtenção de dados: Cartolano FDC, Pappiani C, Freitas MCP; Análise e interpretação dos dados: Cartolano FDC, Pappiani C, Figueiredo Neto AM, Carioca AAF; Análise estatística: Cartolano FDC, Carioca AAF; Obtenção de financiamento: Figueiredo Neto AM; Redação do manuscrito: Cartolano FDC; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Cartolano FDC, Freitas MCP.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pelo INCT-FCX, NAP-FCX-USP, FAPESP e CNPq.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Flavia De Conti Cartolano pela Universidade de São Paulo.

Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo sob o número de protocolo 1126/11 e pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo sob o número 2264. Todos os procedimentos envolvidos nesse estudo estão de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, atualizada em 2013. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes incluídos no estudo.

Referências

1. World Health Organization. (WHO). Prevention of cardiovascular disease – Guidelines for assessment and management of cardiovascular risk. Geneva; 2007. [Series of Technical Reports].
2. Upadhyay RK. Emerging risk biomarkers in cardiovascular diseases and disorders. *J Lipids*. 2015;2015:971453. doi: 10.1155/2015/971453.
3. Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2002;161(12):245-54. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(01\)00677-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(01)00677-3).
4. Hirayama S, Miida T. Small dense LDL: an emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*. 2012 Dec 24;414:215-24. doi: 10.1016/j.cca.2012.09.010.
5. Nikolic D, Katsiki N, Montalto G, Isenovic ER, Mikhailidis DP, Rizzo M. Lipoprotein subfractions in metabolic syndrome and obesity: clinical significance and therapeutic approaches. *Nutrients*. 2013;5(3):928-48. doi: 10.3390/nu5030928.
6. Camont L, Lhomme M, Rached F, Le Goff W, Negre-Salvayre A, Salvayre R, et al. Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(12):2715-23. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301468.
7. Woudberg NJ, Goedecke JH, Blackhurst D, Frias M, James R, Opie LH, et al. Association between ethnicity and obesity with high-density lipoprotein (HDL) function and subclass distribution. *Lipids Health Dis*. 2016 May 11;15:92. doi: 10.1186/s12944-016-0257-9.
8. Kahn HS, Valdez R. Metabolic risks identified by the combination of enlarged waist and elevated triacylglycerol concentration. *Am J Clin Nutr*. 2003;78(5):928-34. PMID: 14594778.
9. Ioachimescu AG, Brennan DM, Hoar BM, Hoogwerf BJ. The lipid accumulation product and all-cause mortality in patients at high cardiovascular risk: a PreCIS database study. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(9):1836-44. doi: 10.1038/oby.2009.453.

10. Kahn HS. The "lipid accumulation product" performs better than the body mass index for recognizing cardiovascular risk: a population-based comparison. *BMC Cardiovasc Disord.* 2005 Sep 8;5:26. doi: 10.1186/1471-2261-5-26.
11. Kahn HS. The lipid accumulation product is better than BMI for identifying diabetes: a population-based comparison. *Diabetes Care.* 2006;29(1):151-3. doi: <https://doi.org/10.2337/diacare.29.01.06.dc05-1805>.
12. Oh JY, Sung YA, Lee HJ. The lipid accumulation product as a useful index for identifying abnormal glucose regulation in young Korean women. *Diabet Med.* 2013;30(4):436-42. doi: 10.1111/dme.12052.
13. Tankó LB, Bagger YZ, Qin G, Alexandersen P, Larsen PJ, Christiansen C. Enlarged waist combined with elevated triglycerides is a strong predictor of accelerated atherogenesis and related cardiovascular mortality in postmenopausal women. *Circulation.* 2005;111(15):1883-90. doi: 10.1161/01.CIR.0000161801.65408.8D.
14. Lwow F, Jedrzejuk D, Milewicz A, Szmigiero L. Lipid accumulation product (LAP) as a criterion for the identification of the healthy obesity phenotype in postmenopausal women. *Exp Gerontol.* 2016 Sep;82:81-7. doi: 10.1016/j.exger.2016.06.007.
15. Nascimento JX, Chein MB, Sousa RM, Ferreira AS, Navarro PA, Brito LM. Importance of lipid accumulation product index as marker of CVD risk in PCOS women. *Lipids Health Dis.* 2015 Jun 24;14:62. doi: 10.1186/s12944-015-0061-y.
16. Macut D, Tziomalos K, Antic-Bozic I, Bjekic-Macut J, Katsikis I, Papadakis E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with insulin resistance and lipid accumulation product in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2016 Jun;31(6):1347-53. doi: 10.1093/humrep/dew076.
17. Costa EC, Ferezini De Sá JC, Soares EM, Lemos TM, Maranhão TM, Azevedo GD. Evaluation of cardiovascular risk by the LAP index in non-obese patients with polycystic ovary syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2010;54(7):630-5. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302010000700007>.
18. Wehr E, Pilz S, Boehm BO, März W, Obermayer-Pietsch B. The lipid accumulation product is associated with increased mortality in normal weight postmenopausal women. *Obesity (Silver Spring).* 2011;19(9):1873-80. doi: 10.1038/oby.2011.42.
19. Maturana MA, Moreira RM, Spritzer PM. Lipid accumulation product (LAP) is related to androgenicity and cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *Maturitas.* 2011;70(4):395-9. doi: 10.1016/j.maturitas.2011.09.012.
20. Pontes AG, Rehme MF, Martins AM, Micussi MT, Maranhão TM, Pimenta WP, et al. Insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome: relationship with anthropometric and biochemical variables. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2012;34(2):74-9. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-72032012000200006>.
21. D'Agostino RB, Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: The Framingham Heart Study. *Circulation.* 2008;117(6):743-53. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.699579.
22. Mosca L, Benjamin EJ, Berra K, Bezanson JL, Dolor RJ, Lloyd-Jones DM, et al. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women 2011 update: a guideline from the American Heart Association. *Circulation.* 2011;123(11):1243-62. doi: 10.1161/CIR.0b013e31820faaf8. Erratum in: *Circulation.* 2011;123(22):e624; *Circulation.* 2011;124(16):e427.
23. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18(6):499-502. PMID: 4337382.
24. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412-9. PMID: 3899825.
25. Koba S, Hirano T, Kondo T, Shibata M, Suzuki H, Murakami M, et al. Significance of small dense low-density lipoproteins and other risk factors in patients with various types of coronary heart disease. *Am Heart J.* 2002;144(6):1026-35. doi: 10.1067/mhj.2002.126119.
26. Mirmiran P, Bahadoran Z, Azizi F. Lipid accumulation product is associated with insulin resistance, lipid peroxidation, and systemic inflammation in type 2 diabetic patients. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2014;29(4):443-9. doi: 10.3803/EnM.2014.29.4.443.
27. Kwon SW, Yoon SJ, Kang TS, Kwon HM, Kim JH, Rhee J, et al. Significance of small dense low-density lipoprotein as a risk factor for coronary artery disease and acute coronary syndrome. *Yonsei Med J.* 2006;47(3):405-14. doi: 10.3349/yjm.2006.47.3.405.
28. Shen H, Xu L, Lu J, Hao T, Ma C, Yang H, et al. Correlation between small dense low-density lipoprotein cholesterol and carotid artery intima-media thickness in a healthy Chinese population. *Lipids Health Dis.* 2015 Oct 29;14:137. doi: 10.1186/s12944-015-0143-x.
29. Toth PP, Patti AM, Nikolic D, Giglio RV, Castellino G, Bianucci T, et al. Bergamot reduces plasma lipids, atherogenic small dense LDL, and subclinical atherosclerosis in subjects with moderate hypercholesterolemia: a 6 months prospective study. *Front Pharmacol.* 2016 Jan 6;6:299. doi: 10.3389/fphar.2015.00299.
30. Shen H, Zhou J, Shen G, Yang H, Lu Z, Wang H. Correlation between serum levels of small, dense low-density lipoprotein cholesterol and carotid stenosis in cerebral infarction patients > 65 years of age. *Ann Vasc Surg.* 2014;28(2):375-80. doi: 10.1016/j.avsg.2013.01.029.
31. Eppinga RN, Hartman MH, van Veldhuisen DJ, Lexis CP, Connelly MP, Lipsic E, et al. Effect of metformin treatment on lipoprotein subfractions in non-diabetic patients with acute myocardial infarction: a glycometabolic intervention as adjunct to primary coronary intervention in ST elevation myocardial infarction (GIPS-III) trial. *PLoS One.* 2016;11(1):e0145719. doi: 10.1371/journal.pone.0145719.
32. Asztalos BF, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Cox CE, Batista MC, et al. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(11):2181-7. doi: 10.1161/01.ATV.0000146325.93749.a8.
33. O'Neill F, McLoughlin E, Riwanto M, Manz J, Adler A, Suttil E, et al. Reproducibility and biological variability of HDL's vascular functional assays. *Atherosclerosis.* 2015;241(2):588-94. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.06.005.
34. El Harchaoui K, Arsenault BJ, Franssen R, Despres JP, Hovingh GK, Stroes ES, et al. High-density lipoprotein particle size and concentration and coronary risk. *Ann Intern Med.* 2009;150(2):84-93. doi: 10.7326/0003-4819-150-2-200901200-00006.
35. Pankow JS, Duncan BB, Schmidt MI, Ballantyne CM, Couper DJ, Hoogeveen RC, et al. Fasting plasma free fatty acids and risk of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes Care.* 2004;27(1):77-82. doi: <https://doi.org/10.2337/diacare.27.1.77>.
36. Il'yasova D, Wang F, D'Agostino RB Jr, Hanley A, Wagenknecht LE. Prospective association between fasting NEFA and type 2 diabetes: impact of post-load glucose. *Diabetologia.* 2010;53(5):8668-74. doi: 10.1007/s00125-010-1657-4.
37. Sarafidis PA, Bakris GL. Non-esterified fatty acids and blood pressure elevation: a mechanism for hypertension in subjects with obesity/insulin resistance? *J Hum Hypertens.* 2007;21(1):12-9. doi: 10.1038/sj.jhh.1002103
38. Djoussé L, Biggs ML, Ix JH, Kizer JR, Lemaitre RN, Sotoodehnia N, et al. Nonesterified fatty acids and risk of sudden cardiac death in older adults. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012; 5(2): 273-8. doi: 10.1161/CIRCEP.111.967661.
39. Morita S, Shimajiri Y, Sakagashira S, Furuta M, Sanke T. Effect of exposure to non-esterified fatty acid on progressive deterioration of insulin secretion in patients with Type 2 diabetes: a long-term follow-up study. *Diabet Med.* 2012;29(8):980-5. doi: 10.1111/j.1464-5491.2011.03566.x.
40. Sambataro M, Perseghin G, Lattuada G, Beltramello G, Luzi L, Pacini G. Lipid accumulation in overweight type 2 diabetic subjects: relationships with insulin sensitivity and adipokines. *Acta Diabetol.* 2013; 50(3): 301-7. doi: 10.1007/s00592-011-0366-x.

