



Estimación del colesterol LDL a través de la ecuación brasilera: comparación con otras metodologías

Marvin Querales,*† María Isabel Domínguez,*† Susan Rojas*

Palabras clave:

Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad, ecuación brasilera, comparación.

Key words:

Low-density lipoprotein cholesterol, Brazilian equation, comparison.

* Departamento de Bioquímica. Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas.

† Instituto de Biología Molecular de Parásitos (InBioMolP).

Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

Correspondencia:
Marvin Querales
Av. Bolívar Norte,
Sector La Ceiba,
Callejón Peña-Pérez,
Edif. Somos,
Apto. 6-1,
Valencia, Venezuela.
Fono: +58 [241]
8380810
E-mail:
querales.marvin@
gmail.com

Recibido:
26/12/2014
Aceptado:
19/02/2015

RESUMEN

Introducción: Recientemente fue propuesta una ecuación brasilera para la estimación del colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL-c), con pocos estudios que la empleen en el resto de Latinoamérica. **Objetivo:** Utilizar la ecuación brasilera en pacientes venezolanos y comparar sus resultados con otras metodologías. **Material y métodos:** A 98 pacientes les fueron medidos los niveles de LDL-c en suero a través de la ecuación brasilera y otras tres metodologías: fórmula de Friedewald, técnica de precipitación y método directo automatizado. **Resultados:** Los valores obtenidos por la ecuación brasilera representaron los datos con la menor dispersión y equivalentes a la metodología directa, siendo inferiores a las otras metodologías, sobre todo en los rangos de triglicéridos menores a 151 y mayores a 200 mg/dL. El número de pacientes clasificados con un riesgo cardiovascular bajo, medio y alto fue estadísticamente similar entre la ecuación brasilera y el método directo, con variaciones con la fórmula de Friedewald y la técnica de precipitación. **Conclusiones:** La ecuación brasilera y la metodología directa son equivalentes, generando valores inferiores a la fórmula de Friedewald y la técnica de precipitación. Se recomienda la aplicación de esta ecuación en los laboratorios clínicos para el cálculo rutinario de LDL-c.

ABSTRACT

Introduction: A Brazilian equation for the estimation of the low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) was recently proposed, with few studies employing it in the rest of Latin America. **Objective:** To use the Brazilian equation in Venezuelan patients and compare its results with other methodologies. **Material and methods:** LDL-c serum levels were measured in 98 patients through the Brazilian equation and other three methodologies: Friedewald formula, precipitation and computerized direct method technique. **Results:** The values obtained by the Brazilian equation represented data with less dispersion and equivalent to the direct methodology, being inferior to the other methodologies, especially in the triglyceride ranges lower than 151 and greater than 200 mg/dL. The number of patients classified with a low, medium and high cardiovascular risk was statistically equal among the Brazilian equation and the direct method, with variations to the Friedewald formula and the technique of precipitation. **Conclusions:** The Brazilian equation and the direct method are equivalent, generating lower values than the Friedewald formula and the precipitation technique. The application of this equation in clinical laboratories for routine calculation of LDL-c is recommended.

INTRODUCCIÓN

El colesterol unido a las lipoproteínas de baja densidad (LDL-c) constituye desde hace largo tiempo un objetivo primario y de interés médico en las guías internacionales de práctica clínica asociadas a la aterosclerosis.^{1,2} De hecho, el tercer reporte de la *National Cholesterol Education Program (Adult Treatment Panel III)* (NCEP ATP III) destaca la importancia de la disminución de los niveles de LDL-c en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares (ECV), haciendo énfasis en la precisión y exactitud de su estimación.³

Un método exacto para obtener los valores de LDL-c es la precipitación polianiónica con ultracentrifugación, comúnmente conocida como beta cuantificación, recomendada como método de referencia.⁴ Sin embargo, presenta varias desventajas desde el punto de vista técnico y operativo: grandes volúmenes de muestra, reactivos costosos y procedimientos laboriosos.⁵ Debido a esto, se han buscado alternativas más accesibles y fáciles para su estimación. La fórmula de Friedewald⁶ representa el método usado en la mayoría de los laboratorios clínicos. No obstante, presenta como inconvenientes que en muestras de suero que posean trazas de quilomicrones,

el valor de LDL-c se subestima, ya que una concentración elevada de quilomicrones incrementa los valores de triglicéridos (TG) y desciende la proporción colesterol/TG en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), ocasionando, por ende, un error en la estimación de LDL-c. En similitud con este argumento, su uso no está recomendado cuando la concentración de TG es mayor a 400 mg/dL.⁷

Dentro de los métodos directos y económicos para determinar el LDL-c se encuentran la precipitación con agentes químicos como el polivinilsulfato⁸ y aquéllos que emplean ensayos homogéneos.⁷ Los primeros constituyen una buena alternativa, aun cuando hay que tomar en cuenta que en casos de hipertrigliceridemia, se corre el riesgo de precipitar otras fracciones ricas en colesterol que se encuentren en el sobrenadante. Los segundos presentan como mayor ventaja la automatización completa en el cálculo del LDL-c, aumentando la precisión de la medición y disminuyendo apreciablemente el error de pipeteo.

Recientemente, de Cordova y de Cordova⁹ describieron una nueva fórmula para el cálculo de LDL-c. Estos investigadores evaluaron los valores de LDL-c de 10,664 individuos brasileños empleando el método Wako de ensayo directo homogéneo y obtuvieron una «fórmula brasilera» dependiente solamente del colesterol total (CT) y el colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL-c) que exhibió, además, la mayor exactitud entre todas las fórmulas evaluadas.

Son escasas las investigaciones que han evaluado o comparado esta fórmula brasilera con otras metodologías para el cálculo de LDL-c. Laserna y Timón¹⁰ reportan que dicha fórmula, aplicada a una población española, no muestra ventajas considerables en relación con otros métodos, opinando, además, que tiene poca aplicabilidad. Sin embargo, en estudios venezolanos no existen reportes del uso de la misma; por esta razón, el objetivo principal de este trabajo fue comparar la estimación del LDL-c empleando la ecuación brasilera con los métodos fórmula de Friedewald, técnica de precipitación y metodología directa automatizada en un grupo de individuos adultos de Venezuela.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio descriptivo y correlacional que incluyó 98 pacientes adultos con edades comprendidas entre 18 y 50 años que acudieron a un laboratorio clínico privado ubicado en la ciudad de Valencia, Venezuela, durante el mes de mayo del año 2009. Se consideraron las normas éticas establecidas por la Organización Mundial de la Salud; por esta razón, los participantes firmaron un consentimiento informado.¹¹

Los individuos acudieron al laboratorio después de 12 horas de ayuno y sin haber ingerido alcohol en las 48 horas anteriores a la toma de muestra. Inicialmente, se aplicó una encuesta mediante la cual se obtuvieron datos personales y antecedentes relacionados con diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares.

Se extrajo una muestra de sangre (8 mL) por punción venosa en el pliegue del codo. Haciendo uso de un analizador automatizado de química clínica Hitachi 911 (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA), se determinaron en suero el mismo día de la toma de muestra CT y TG mediante métodos enzimático-colorimétricos, y HDL-c después de precipitación con fosfotungstato. Se emplearon reactivos comerciales de Roche de acuerdo con las condiciones de reacción establecidas por el fabricante, realizando controles de calidad con BioRad para CT, LDL-c, HDL-c y TG, obteniéndose los siguientes coeficientes de variación intraensayo: 2.9% para CT; 2.5% para TG; 1.2% para HDL-c.

Una vez obtenidos los valores de CT, HDL-c y TG mediante el analizador automatizado, se procedió, a través del mismo equipo, a determinar el valor del LDL-c empleando el ensayo homogéneo o metodología directa. Para la cuantificación de la misma, se realiza una solubilización micelar selectiva de estas partículas por un detergente no iónico y la interacción de un compuesto de azúcar y lipoproteínas (VLDL y quilomicrones). Al añadir un detergente en el método enzimático de determinación de colesterol (reacción de acoplamiento de colesterol esterasa-colesterol oxidasa), la actividad relativa del colesterol en las fracciones de lipoproteínas aumenta en el siguiente orden: HDL < quilomicrones < VLDL < LDL. En presencia de Mg^{++} , un compuesto de azúcar reduce la acción enzimática de medición del colesterol en VLDL y quilomicrones. Al combinar un compuesto de azúcar y un detergente, se puede efectuar la determinación enzimática y colorimétrica selectiva del colesterol LDL-c en el suero.

De forma paralela, se hizo el cálculo de la concentración de LDL-c utilizando la fórmula de Friedewald ($[LDL-c] = [CT] - [HDL-c + TG/5]$), fundamentándose en que la mayoría de los triglicéridos plasmáticos son transportados por las VLDL y la concentración de colesterol de las VLDL corresponde a un quinto del valor de TG.⁶ En vista de que la aplicación de esta fórmula sólo es válida mientras la concentración de triglicéridos no exceda de 400 mg/dL, fueron excluidos de este estudio aquellos pacientes cuya hipertrigliceridemia sobrepasara este valor.

Los valores de LDL-c fueron igualmente determinados por el método de precipitación. Para ello, estas partículas fueron precipitadas en el suero empleando sulfato de polivinilo disuelto en polietilenglicol (P.M. 600 al 25% pH 6.7). El sulfato de polivinilo precipita selectivamente las

moléculas de LDL-c, quedando, por tanto, suspendidas en el sobrenadante las partículas de HDL-c y VLDL-c, las cuales se determinan enzimáticamente siguiendo las técnicas enzimáticas para el cálculo de CT. El valor de las LDL-c precipitadas en el sedimento se obtiene por diferencia entre el CT en el suero y CT en el sobrenadante. El equipo de lectura utilizado fue un espectrofotómetro StatFax 1904 Plus (Awareness Technology, Palm City, Florida, USA). Se emplearon sueros controles normal y patológico comerciales (Standantrol 1 y 2, Wiener lab) y se realizó un control de calidad interno con *pool* de sueros preparados en este laboratorio. Los coeficientes de variación intraensayo hallados fueron 3.1% para CT; 3.8% para TG; 1.5% para HDL-c. Es importante destacar que las pipetas automáticas y el equipo de lectura se encontraban calibrados y, para minimizar el error sistemático, las lecturas fueron realizadas por el mismo analista.

El último método para la obtención de las concentraciones de LDL-c correspondió a la fórmula brasilera propuesta por de Cordova y de Cordova.⁹ La misma expresa que el LDL-c se puede calcular a partir de $\frac{3}{4}$ (CT-HDL-c), o más precisamente 0.7516 (CT-HDL-c), que surge a partir de que $\frac{3}{4}$ de los individuos evaluados obtienen un índice LDL-c/colesterol no HDL entre 0.65 y 0.85. Además, se indica que los niveles de LDL-c son virtualmente independientes de las concentraciones de TG.

Para cada una de las metodologías evaluadas, los pacientes fueron clasificados según el criterio de la NCEP, la cual ha establecido los valores límite para evaluar el riesgo coronario, en donde niveles de LDL-c < 130 mg/dL; entre 130 y 159 mg/dL, y ≥ 160 mg/dL corresponden a un riesgo coronario bajo, moderado y elevado, respectivamente.³

Para el análisis estadístico se aplicó la prueba de Kolmogorov Smirnov para corroborar la normalidad de la muestra. Los datos fueron sometidos a un análisis descriptivo, determinando promedio y desviación estándar (media \pm DE). Una vez obtenidos los valores de LDL-c siguiendo las metodologías previamente mencionadas, los mismos fueron estratificados con base en los niveles de TG y luego, las medias aritméticas de la ecuación brasilera fueron comparadas versus el resto de las metodologías mediante la prueba t de Student. Además, para observar la relación entre las variables, se realizó un análisis de regresión lineal simple. En vista de que la intención del estudio era probar que los valores de LDL-c arrojados por las metodologías eran iguales y no una asociación lineal entre ellos, se plantearon modelos matemáticos de regresión sin intercepto. Por otro lado, para evaluar las proporciones de los pacientes clasificados de acuerdo con su riesgo cardiovascular según la metodología de LDL-c, se aplicó la prueba de

hipótesis para la proporción. El nivel de significancia adoptado fue $p < 0.05$. El paquete estadístico utilizado fue SPSS versión 17.

RESULTADOS

De 98 pacientes evaluados, 37 (37.8%) pertenecían al género masculino y 61 (62.2%) al femenino. Los valores promedio de los parámetros bioquímicos medidos fueron CT: 194.46 ± 43.54 mg/dL; HDL-c: 51.12 ± 12.36 mg/dL y TG: 132.88 ± 76.93 mg/dL.

La comparación de los valores promedio de LDL-c obtenidos en las cuatro metodologías se evidencia en la *figura 1*. Si bien existe mucho solapamiento de datos entre todas las técnicas, se observa que los valores de LDL-c obtenidos por la ecuación brasilera representan la menor dispersión, pues evidencian una distribución bastante compacta. Además, es posible notar que los valores comprendidos entre los cuartiles 1 y 3 de la ecuación brasilera tienden a ser ligeramente inferiores a las demás técnicas, mostrando un comportamiento similar a los resultados arrojados por la metodología directa. La fórmula de Friedewald, por su parte, muestra resultados más dispersos en relación con la ecuación brasilera, siendo esta diferencia más notoria en la técnica de precipitación.

Las concentraciones de LDL-c se encuentran expresadas en el *cuadro 1*. Se observa que a valores de TG inferiores a 151 mg/dL, los niveles de LDL-c obtenidos con la ecuación brasilera son equivalentes a los arrojados por la metodología directa, pero estadísticamente inferiores a los mostrados por la técnica de precipitación y la fórmula de Friedewald; sin embargo, estas diferencias

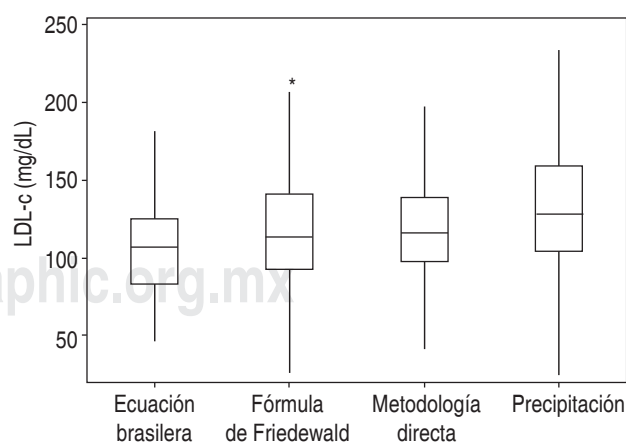


Figura 1. Distribución de los valores de LDL-c obtenido mediante las cuatro metodologías en estudio.

no son observables en el rango de triglicéridos 151-200 mg/dL. A niveles de TG > 200 mg/dL, los resultados de la ecuación brasilera son estadísticamente inferiores solamente a los de la técnica de precipitación.

La comparación de los métodos fue evaluada siguiendo un análisis de regresión lineal presentado en la *figura 2*. La ecuación obtenida al comparar los resultados obtenidos por la ecuación brasilera con la fórmula de Friedewald mostró el mejor ajuste de los datos con el mayor coeficiente de regresión (86,25%) (*figura 2A*), seguida de la comparación con la metodología directa (75,88%) (*figura 2B*). A su vez, la menor correlación entre los datos fue observada al comparar los datos de la ecuación brasilera con la técnica de precipitación, mostrando un coeficiente de regresión de 66,6% y una nube de puntos mucho más dispersa (*figura 2C*).

Tal como se muestra en el *cuadro II*, el número de pacientes clasificados con un riesgo bajo es estadísticamente

superior al número aportado por la técnica de precipitación y la fórmula de Friedewald; no obstante, la proporción es equivalente con la metodología directa. Con la clasificación de riesgo intermedio no hay ninguna diferencia entre las metodologías, mientras que en el riesgo alto, la ecuación brasilera es estadísticamente inferior a la técnica de precipitación.

DISCUSIÓN

Las concentraciones elevadas de LDL-c representan uno de los principales factores de riesgo para las ECV; por ello, son un objetivo fundamental en el tratamiento de las dislipidemias.¹ Esta molécula puede ser estimada por varias metodologías, cada una con diversas ventajas y desventajas que la hacen susceptible o no de ser empleada. Recientemente, se propuso una ecuación basada en un estudio en Brasil con pocas investigaciones al respecto;

Cuadro I. Comparación de los valores promedio de LDL-c (mg/dL) obtenidos con la ecuación brasilera y las otras metodologías, con base en los niveles de triglicéridos.

Metodología	Rango de triglicéridos (mg/dL)					
	< 151 (n = 67)	p	151-200 (n = 13)	p	> 200 (n = 18)	p
Ecuación brasilera	110.29 ± 32.09		122.69 ± 21.73		122.11 ± 26.80	
Fórmula de Friedewald	115.58 ± 40.91	0.018	129.00 ± 29.14	0.537	110.06 ± 35.35	0.257
Metodología directa	111.53 ± 33.93	0.053	134.62 ± 28.10	0.238	124.72 ± 32.95	0.796
Precipitación	125.56 ± 44.22	0.001	141.46 ± 42.62	0.170	141.28 ± 26.18	0.036

Significativo: p < 0.05.

Cuadro II. Comparación del número de pacientes clasificados según su riesgo coronario con la ecuación brasilera y las otras metodologías.

Metodología	Riesgo coronario					
	Bajo	p	Intermedio	p	Elevado	p
Ecuación brasilera	78		12		8	
Fórmula de Friedewald	64	0.0252	22	0.0592	12	0.3452
Metodología directa	66	0.0522	20	0.1221	12	0.3452
Precipitación	51	0.0001	21	0.0858	26	0.0007

Significativo: p < 0.05.

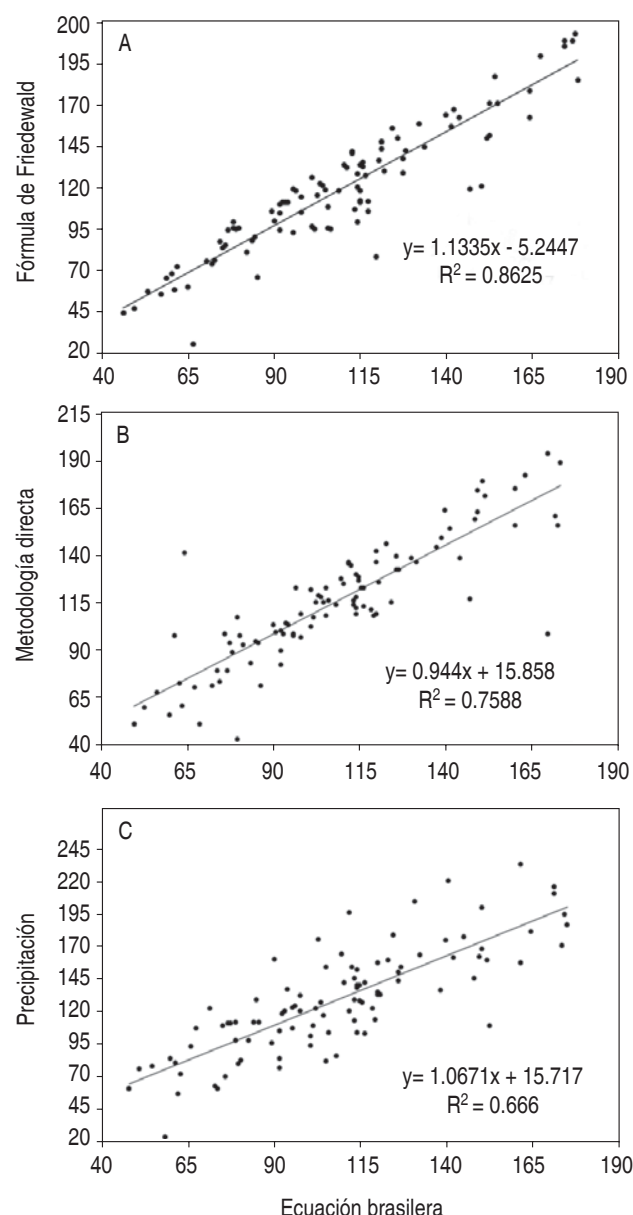


Figura 2. Análisis de regresión lineal de los valores de LDL-c obtenidos mediante la fórmula de Friedewald (A), metodología directa (B) y precipitación (C) versus ecuación brasilera.

por esta razón, en este trabajo se tuvo como finalidad emplear esta ecuación y compararla con otras metodologías de rutina para el cálculo del LDL-c.

Analizando los resultados, es posible notar que la ecuación brasilera tiende a arrojar valores de LDL-c ligeramente menores al resto de las metodologías, siendo la técnica de precipitación la que arroja los resultados más elevados y dispersos, seguida de la fórmula de Friedewald

y de la metodología directa de los ensayos homogéneos. Si bien la fórmula brasilera tuvo la mayor correlación con la fórmula de Friedewald, el comportamiento y distribución de la misma fueron bastante similares a la metodología directa, incluyendo la proporción de pacientes clasificados según su riesgo cardiovascular; resultado éste que coincide con lo reportado por sus propios autores.⁹ Dada la coincidencia entre la metodología directa y la ecuación propuesta, de Cordova y de Cordova sugieren la aplicación de la misma a la población general. De hecho, ciertos tipos de pacientes, como los diabéticos tipo 2 y medicados con atorvastatina y simvastatina, han mostrado un comportamiento mejor y más estable de los niveles de LDL-c cuando éstos son generados por la fórmula brasilera que con la fórmula de Friedewald, tomando como patrón de referencia un método directo.¹²

Sin embargo, Laserna-Mendieta y Timón-Zapata¹⁰ obtuvieron resultados contrarios a lo reportado por los autores de la ecuación brasilera, reflejando que la fórmula de Friedewald se ajusta mejor a los resultados de una metodología directa que la ecuación propuesta por de Cordova y de Cordova, basando sus diferencias, principalmente, en el tipo de método directo automatizado empleado para efectuar la comparación. Este punto es bastante válido, pues es posible que sea la causa de la similitud entre la ecuación brasilera y la metodología directa encontrada en nuestro estudio, aunque también cabe la posibilidad de la influencia del área geográfica, pues Brasil y Venezuela presentan cierta similitud por ser países fronterizos, a diferencia de la población abordada por Laserna-Mendieta y Timón-Zapata, que fue española.

En este trabajo, se observaron valores de LDL-c obtenidos a través de la ecuación brasilera y metodología directa menores a los de la fórmula de Friedewald, coincidiendo con otros estudios, como el de Boshtam y colaboradores¹³ en una población iraní. Estos autores encontraron que la fórmula de Friedewald sobreestima las concentraciones de LDL-c, siendo esto de importancia crítica en los pacientes de alto riesgo; además, sugieren que de ser utilizada una fórmula para la estimación de esta lipoproteína, la misma debe ser especial y adaptable a cada tipo de población. Resultados similares fueron obtenidos en poblaciones jóvenes de Japón.^{14,15} No obstante, existen investigaciones que indican que la fórmula de Friedewald más bien subestima los niveles de LDL-c, hecho no observado en este estudio. Muhammad y su grupo⁷ encontraron valores de LDL-c obtenidos con la fórmula de Friedewald significativamente menores a los de la metodología directa, indicando, además, que esta ecuación clasifica erróneamente al 11% de los individuos según su riesgo coronario establecido por la NCEP. De ahí

que desde hace algún tiempo se sugiera la metodología directa como el método más idóneo para la estimación de LDL-c, aunque sigue manteniendo la desventaja del elevado costo en los equipos y reactivos requeridos.¹⁶ Por esta razón, técnicas que generen resultados equivalentes, como la ecuación brasilera, pueden ser fácilmente adoptadas por los laboratorios clínicos.

En lo que respecta a la técnica de precipitación, la misma generó valores más elevados y dispersos que los arrojados por la fórmula descrita por de Cordova y de Cordova. Una posible explicación de esta sobreestimación de LDL-c es que el reactivo precipitante utilizado tiende a precipitar otras fracciones ricas en colesterol que se encuentren en el sobrenadante. Sin embargo, es necesario acotar que la técnica de precipitación tan sólo mostró diferencia estadística cuando las concentraciones de TG eran inferiores a 151 mg/dL o superiores a 200 mg/dL, por lo que su utilidad para el cálculo de LDL-c a concentraciones de TG entre estos rangos (151-200 mg/dL) es igual de válida que los otros métodos.⁴

Este estudio muestra una limitante clara, que corresponde a la no utilización del método estándar para la determinación de LDL-c (ultracentrifugación y beta cuantificación de las lipoproteínas) para comparar la exactitud de la ecuación brasilera en la estimación de la misma. No obstante, la determinación directa basada en los ensayos homogéneos representa una metodología que, si se lleva a cabo bajo estrictas condiciones de calibración como las llevadas a cabo en este estudio, genera un error de estimación bastante bajo y permite comparar otras metodologías.

En conclusión, los valores de LDL-c obtenidos por las técnicas de precipitación y fórmula de Friedewald tienden a sobreestimar los valores de la ecuación brasilera, siendo estos últimos distribuidos de forma equivalente a los datos arrojados por el método directo automatizado, no teniendo diferencias entre sí en la clasificación de pacientes según su riesgo cardiovascular. Es por ello que, de momento, se recomienda la aplicación de la ecuación brasilera en los laboratorios clínicos para el cálculo rutinario de LDL-c. No obstante, se sugiere la realización de otros estudios en poblaciones venezolanas para validar la aplicación o no de la misma empleando el método estándar de referencia.

REFERENCIAS

1. Reiner Z, Catapano A, De Backer G, Graham I, Taskinen M, Wiklund O et al. European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG) 2008-2010 and 2010-2012 Committees. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. *Eur Heart J*. 2011; 32 (14): 1769-1818.
2. Smith S, Benjamin E, Bonow R, Braun L, Creager M, Franklin B et al. World Heart Federation and the Preventive Cardiovascular Nurses Association. AHA/ACC Secondary prevention and risk reduction therapy for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2011 update: a guideline from the American Heart Association and American College of Cardiology Foundation. *Circulation*. 2011; 124 (22): 2458-2473.
3. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment Panel III). *JAMA*. 2001; 285: 2486-2497.
4. Querales M, Cruces M, Sánchez C, Querales M, Rojas S, Sánchez L. Medida del colesterol de lipoproteínas de baja densidad utilizando tres metodologías. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2012; 46 (1): 31-37.
5. Kumar P. Calculated low-density lipoprotein cholesterol: Friedewald's formula versus other modified formulas. *ILSMR*. 2014; 4: 25-31.
6. Friedewald W, Levy R, Fredrickson D. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972; 18: 499-502.
7. Muhammad A, Dilshad A, Farooq A. Comparison of Friedewald formula and modified Friedewald formula with direct homogeneous assay for low density lipoprotein cholesterol estimation. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2014; 24 (1): 8-12.
8. Assmann G, Jabs H, Kohnert U, Nolte W, Schriewer H. LDL cholesterol determination in blood serum following precipitation of LDL with polyvinylsulfate. *Clin Chim Acta*. 1984; 140: 77-83.
9. De Cordova C, de Cordova M. A new accurate simple formula for LDL-cholesterol estimation based on directly measured blood lipids from a large cohort. *Ann Clin Biochem*. 2013; 50: 13-19.
10. Laserna-Mendieta E, Timón-Zapata J. Comparison of the performance of the Brazilian equation for LDL-c estimation with other proposed formulae in a Spanish population. *Ann Clin Biochem*. 2013; doi: 10.1177/0004563213489965.
11. Cañete R, Guilhem D, Brito K. Consentimiento informado: algunas consideraciones actuales. *Acta Bioeth*. 2012; 18 (1): 121-127.
12. Sathyapalan T, Atkin S, Kilpatrick E. LDL cholesterol variability in patients with type 2 diabetes taking atorvastatin and simvastatin: a comparison of two formulae for LDL-C estimation. *Ann Clin Biochem*. 2014; doi: 10.1177/0004563214533515.
13. Boshtam M, Ramezani M, Naderi G, Sarrafzadegan N. Is Friedewald formula a good estimation for low-density lipoprotein level in Iranian population? *J Res Med Sci*. 2012; 17: 519-522.
14. Kawase R, Nakaoka H, Nakatani K, Inagaki M, Yuasa-Kawase M, Tsubakio-Yamamoto K et al. Differential reactivities of four homogeneous assays for LDL-cholesterol in serum to intermediate-density lipoproteins and small dense LDL: comparisons with the Friedewald equation. *Clin Chim Acta*. 2009; 410: 31-38.
15. Fukuyama N, Homma K, Wakana N, Kudo K, Suyama A, Ohazama H et al. Validation of the Friedewald equation for evaluation of plasma LDL-cholesterol. *J Clin Biochem Nutr*. 2008; 43: 1-5.
16. Chung-Huang T, Hsin-Hung W, Shao-Jen W. Comparison of various formulae for estimating low-density lipoprotein cholesterol by a combination of ages and genders in Taiwanese adults. *BMC Cardiovasc Disord*. 2014; 14: 113-121.