

FOCUS

COS'È UNO STUDIO DI RANDOMIZZAZIONE MENDELIANA E QUALI SONO LE APPLICAZIONI IN AMBITO DI DISLIPIDEMIE

What is a Mendelian randomization study and what are the applications in the field of dyslipidemias

FEDERICA GALIMBERTI^{1,2}, ELENA OLMASTRONI^{1,2}

¹*Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP), Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan, Milan, Italy;*

²*MRC/BHF Cardiovascular Epidemiology Unit, Department of Public Health and Primary Care, University of Cambridge, Worts Causeway, CB1 8RN Cambridge, United Kingdom*

SUMMARY

Different approaches have been implemented to overcome the limitations that typically and differently influence both randomized clinical trials and observational studies. Mendelian randomization studies, in which functional genetic variants serve as tools (“instrumental variables”) to approximate modifiable environmental exposures, have been developed and implemented in the context of observational epidemiological studies to strengthen causal inferential estimates in non-experimental situations. Since genetic variants are randomly transferred from parents to offspring at the time of gamete formation, they can realistically mimic the random allocation process of treatment in a randomized clinical trial, offering a strategy to eliminate, or anyway reduce, the typical residual confounding of observational studies, thus making it possible to obtain generalizable results for the entire population. If correctly conducted and carefully interpreted, Mendelian randomization studies can provide useful scientific evidence to support or reject causal hypotheses that verify the association between environmental exposures and diseases. This evidence may provide useful information to identify new potential drug targets, with a higher probability of success than approaches based on animal studies or in vitro. This review summarizes the history and context of Mendelian randomization, the main features of the study design, the assumptions for a correct use, and a brief discussion on the advantages and disadvantages of this approach. In addition, an overview of what the Mendelian randomization technique has contributed to date in the field of dyslipidemias has also been presented.

Keywords: *Genetic Epidemiology; Mendelian randomization; Genetic variant; Instrumental Variable; Causal inference; Cardiovascular diseases.*

Indirizzo per la corrispondenza

Federica Galimberti

Epidemiology and Preventive Pharmacology Service (SEFAP)

Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan

E-mail: federica.galimberti@unimi.it

Introduzione

Una delle finalità dell'epidemiologia genetica è quella di studiare la frequenza, le cause, la distribuzione e il controllo delle malattie in relazione ai fattori genetici e di approfondire il ruolo di questi e della loro interazione con i fattori ambientali nella frequenza di malattia nelle popolazioni (1). Con l'introduzione di nuove tecniche di studio del genoma umano, questa scienza è via via diventata un supporto all'epidemiologia osservazionale, che studia invece le caratteristiche delle malattie (frequenza, andamento, cause) a livello di popolazione, nel comprendere gli aspetti ereditari delle patologie e la predisposizione individuale a queste, soprattutto in un'ottica di "cura personalizzata" (2).

L'incontro tra queste due scienze nasce da un'esigenza ben precisa: ottenere solide evidenze scientifiche osservando e studiando soggetti "reali", ossia donne e uomini, giovani e anziani che sono sottoposti alla pratica clinico-assistenziale quotidiana, caratterizzati da problemi clinici composti e/o malattie croniche, che spesso comportano l'assunzione di molti farmaci. In altre parole, studiare soggetti che per la loro "complessità" non rientrerebbero nei criteri di inclusione degli studi clinici controllati e randomizzati (RCT), che da sempre sono considerati il *gold-standard* della ricerca clinica, ovvero il disegno di studio più accurato per rispondere ad un quesito diagnostico di causalità, relativo per lo più all'efficacia e alla sicurezza di un trattamento farmacologico (3). In questa tipologia di disegno di studio, la tecnica di randomizzazione, per la quale i soggetti reclutati vengono assegnati in modo casuale al gruppo di intervento (ad esempio esposti al farmaco) o al gruppo di controllo (soggetti non esposti), rende comparabili i gruppi di pazienti per più fattori noti e non

noti ("confondenti"), e consente di accertare che l'associazione fra il fattore di rischio (esposizione) e la malattia outcome sia causale.

Nonostante negli ultimi 40 anni i trial randomizzati e controllati siano stati la pietra angolare per lo sviluppo di innumerevoli strategie terapeutiche, anche in ambito cardiovascolare dove ad esempio gli RCT hanno contribuito a dimostrare il beneficio clinico ottenibile riducendo i livelli delle lipoproteine a bassa densità (LDL), una delle principali criticità di questa tipologia di studio rimane la limitata applicabilità dei risultati in ambito clinico, perché spesso condotti in popolazioni estremamente selezionate e in condizioni assistenziali ideali

Elenco degli argomenti trattati

- La randomizzazione Mendeliana è un metodo di ricerca che fornisce evidenze solide su relazioni causali putative tra fattori di rischio modificabili ed esiti clinici, usando le varianti genetiche per ricreare lo schema di randomizzazione in un contesto osservazionale.
- Gli studi di randomizzazione Mendeliana hanno meno probabilità di essere influenzati da fattori confondenti e da causalità inversa, distorsioni che tipicamente inficiano sulla stima di associazione ottenuta negli studi osservazionali convenzionali.
- Tuttavia, come tutti gli approcci analitici, anche la randomizzazione Mendeliana si basa su assunti, e la plausibilità di queste ipotesi deve essere accertata.
- Gli studi di randomizzazione Mendeliana rappresentano importanti elementi di supporto per il disegno di nuovi trial clinici randomizzati e per l'implementazione delle *policies* e delle misure di sanità pubblica. Tuttavia, la rilevanza delle evidenze ottenute da questo nuovo approccio dovrà essere interpretata alla luce delle evidenze disponibili.
- Gli studi di randomizzazione Mendeliana hanno contribuito alla comprensione della patogenesi della malattia cardiovascolare. In questo ambito, tale approccio, può rappresentare una strategia pratica non solo per personalizzare la prevenzione e il trattamento, ma anche per individuare target farmacologici promettenti per lo sviluppo di nuove terapie.

(limitata validità esterna). E sebbene gli studi osservazionali possano offrire l'opportunità di studiare "situazioni di vita reale", risulta difficile con questi studi provare con certezza un rapporto di causalità, poiché l'associazione fra due variabili non è di per sé una condizione sufficiente a provare una relazione di causa-effetto (4).

L'unica strategia utile a studiare la natura causale di un'associazione utilizzando dati osservazionali, sembra quella di ricreare la tecnica di randomizzazione anche nel contesto osservazionale, per potere da un lato suddividere la popolazione in gruppi omogenei che differiscono solo per il fattore esposizione che si vuole studiare, controllando perciò l'azione di altre variabili estranee all'esposizione, dall'altro lato studiare questa relazione in un campione eterogeneo che consenta di ottenere risultati generalizzabili all'intera popolazione.

L'approccio della "randomizzazione Mendeliana" fornisce una risposta a questa necessità, rappresentando un tentativo di introduzione dello schema di randomizzazione in un contesto osservazionale, tramite l'utilizzo di dati genetici per definire e stimare l'effetto causale di fattori di rischio modificabili (non genetici) (5).

L'approccio della randomizzazione Mendeliana

Il principio della randomizzazione Mendeliana (RM) risale ad almeno 30 anni fa (6) ed è stato attribuito a Katan (7), sebbene nel contesto dell'epidemiologia osservazionale tale termine sia stato utilizzato solo verso la fine dello scorso millennio (8). Thomas e Conti hanno sottolineato che la RM è un'applicazione del metodo delle variabili strumentali, le quali sono comunemente usate in econometria (9). L'uso di questo metodo in epidemiologia ha suscitato un forte interesse e ha subito una rapi-

da crescita, con un ampio riconoscimento delle sue potenzialità statistiche (10-12).

Come suggerisce il nome stesso, il concetto di RM si basa sul principio dell'assortimento indipendente dei caratteri di Mendel (ricordato come "il padre della genetica"), secondo il quale i geni parentali vengono trasferiti alla progenie distribuendosi in maniera casuale (random) al momento della formazione dei gameti. Con questo fenomeno biologico si genera un contesto simile al trial randomizzato controllato, in quanto gli individui di una popolazione ereditano casualmente solo un certo allele di un dato genotipo (variante genetica), proprio come i partecipanti a un trial clinico ricevono casualmente il trattamento che viene testato nel trial (13).

Tuttavia, a differenza del trial randomizzato in cui si valuta l'efficacia di un intervento su un determinato *outcome*, negli studi di RM l'effetto delle varianti geniche (polimorfismo di un determinato gene X) sulla malattia è funzionale alla comprensione del rapporto esistente fra un fenotipo intermedio (come ad esempio i livelli circolanti della proteina codificata dal gene X) ed il rischio di sviluppare l'evento. Nello specifico, il gene polimorfico è uno "strumento" tramite il quale è possibile fare inferenze di causalità fra il suo prodotto (proteina che determina un fenotipo intermedio) e la malattia, in assenza di confondimento, dato che l'effetto dei geni (informazione presente nel corredo genetico sin dalla nascita) è indipendente da fattori ambientali o legati allo stile di vita che, invece, sono elementi tipici di confondimento dell'analisi negli studi osservazionali.

In *Figura 1* è rappresentata l'analogia tra studio di RM e trial randomizzato controllato, richiamando l'attenzione sulla natura non influenzata da fattori confondenti delle esposizioni determinate da varianti genetiche (analogo alla natura libera da

confondimento di un intervento randomizzato), sulla mancanza di possibilità di causalità inversa come influenza dell'associazione esposizione-*outcome* in entrambi i disegni di studio e sull'importanza dei confronti tra i gruppi definiti dalla variante genetica, indipendentemente dall'associazione tra la variante genetica e l'esposizione all'interno di un particolare individuo (14, 15).

Assunti degli studi di randomizzazione Mendeliana e analisi delle variabili strumentali

Nelle analisi di RM si utilizzano varianti genetiche note come strumenti (per questo definite in inglese “*instrumental variables*”, IV) per identificare e provare l'esistenza di un rapporto di causalità tra l'esposizione a fattori di rischio modificabili e *outcome* correlati normalmente al rischio di malattia, in assenza di confondimento.

Più in dettaglio, la variante genetica in studio, che si sa essere associata ad un'esposizione di interesse, funge da *proxy* per livelli più alti o più bassi di esposizione; perciò, un'associazione osservata tra la variante genetica e l'*outcome* sostiene l'ipotesi che l'esposizione in questione sia correlata in maniera causale all'*outcome* stesso (7, 15).

Affinché una variante genetica sia indicata per stabilire delle inferenze di causalità, deve soddisfare tre assunti fondamentali, rappresentati in *Figura 2*:

1. *Assunto di rilevanza*: la variante genetica sia associata in modo causale al fattore di rischio/esposizione di interesse (freccia #1);
2. *Assunto di indipendenza*: i fattori confondenti che intervengono nell'associazione fattore di rischio-*outcome* non siano correlati in alcun modo alla variante genetica (freccia #2);

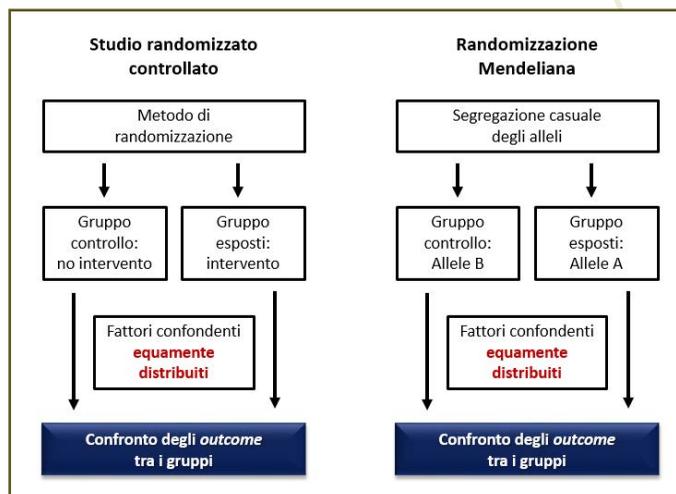


Figura 1 - Confronto tra studio randomizzato controllato e studio di randomizzazione Mendeliana.

3. *Assunto di restrizione di esclusione*: la variante genetica sia associata all'*outcome* solo e soltanto tramite il suo effetto sul fattore di rischio (freccia #3).

Si noti che tali ipotesi devono essere giustificate da una base biologica attendibile (16).

Il primo assunto garantisce che i gruppi definiti dalla variante genetica abbiano livelli medi diversi di esposizione, in modo tale che esista una differenza sistematica tra i due gruppi. Se una variante genetica non è associata in modo significativo (si intenda significatività statistica della forza di associazione) all'esposizione, si parla di variabile strumentale debole, con un potere di predizione di un vero effetto causale che risulterà basso. Il secondo assunto, come già discusso precedentemente, assicura che il confronto tra i gruppi sia libero da *bias*, in quanto tutte le altre variabili possibilmente interferenti sono equamente distribuite tra i gruppi. Infine, il terzo assunto garantisce che il nesso causa-effetto tra la variante genetica e l'*outcome* sia mediato esclusivamente dal fattore di rischio. Questo fa in modo che non vi siano altri *path-*

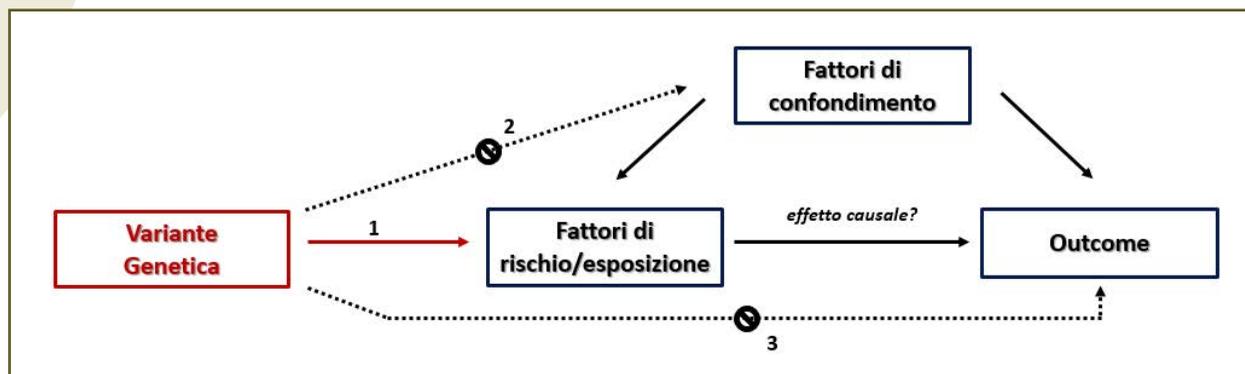


Figura 2 - Rappresentazione grafica del disegno di studio e dei tre assunti (rilevanza, indipendenza, restrizione di esclusione) di una variabile strumentale.

way alternativi a quelle che include l'esposizione oggetto di studio, attraverso i quali la variante possa essere associata all'*outcome* (17).

Nel momento in cui questi assunti sono verificati, è possibile misurare l'associazione tra variante e *outcome*, fornendo una stima, in assenza di confondimento, dell'effetto che l'esposizione "permanente" (*life-long exposure*) al fattore di rischio ha sull'*outcome*, in maniera analoga ad un trial randomizzato a lungo termine.

Violazione degli assunti

Meccanismi biologici

La prima categoria di condizioni che possono determinare una violazione degli assunti, e quindi rendere una variante genetica non valida per stabilire delle inferenze di causalità, è da ricercarsi nei meccanismi biologici sottostanti (17).

Pleiotropia verticale e multifunzionalità dei geni: con questo termine ci si riferisce alla condizione in cui la variante genetica risulta associata a più di un fattore di rischio, rappresentando una *proxy* per più di una esposizione che a sua volta può avere effetto sull'*outcome* di interesse (violazione dell'assunto di restrizione di esclusione).

Se non viene studiata in modo approfondito la variante genetica e il suo effetto sull'esposizione, gli effetti pleiotropici possono rappresentare un problema.

Canalizzazione: il fenomeno di canalizzazione o adattamento biologico consiste nel forzare, o appunto "canalizzare", l'espressione genica verso determinati percorsi. Tale adattamento può essere ottenuto attraverso la ridondanza genetica (più di un gene che ha la stessa o simile funzione) o attraverso percorsi metabolici alternativi.

Eredità non mendeliana

Una seconda categoria di effetti risulta una conseguenza dell'eredità non mendeliana. Sebbene i principi mendeliani affermino che caratteri diversi sono trasmessi indipendentemente l'uno dall'altro, questo non è sempre vero in pratica. Con l'accezione "eredità non mendeliana" ci riferiamo ad un termine che indica un qualsiasi modello ereditario in cui i singoli componenti non segregano secondo le leggi di Mendel, e in particolare secondo la legge di segregazione indipendente (17).

Linkage disequilibrium: è possibile che il *locus* sul cromosoma in studio sia in *linkage disequilibrium* con un altro *locus* polimorfico. In altre parole, un particolare motivo per

cui le varianti genetiche possono essere ereditate insieme è perché queste si trovano fisicamente vicine sullo stesso cromosoma. Ciò sarà fonte di confondimento se sia il *locus* in studio che quello con cui si trova in *linkage disequilibrium* sono entrambi associati all'*outcome* di interesse.

Modificatore di effetto: fenomeno statistico che riguarda l'interazione tra l'effetto di una variabile (tipicamente dell'esposizione) e i valori di una covariata, che determina una variabilità dell'associazione causale dell'esposizione tra gli strati definiti dai livelli della covariata. Fattori che possono determinare questo fenomeno includono ad esempio la variazione epigenetica e *imprinting* genomico. Questa tipologia di effetto raramente da sola comporta una violazione degli assunti per una variabile strumentale; tuttavia potrebbe complicare l'interpretazione dei risultati in uno studio di RM se esistono ragioni biologiche per cui alcune associazioni genetiche risultano più forti, o più deboli, in alcuni strati della popolazione (si pensi ad esempio ad un diverso impatto di alcune varianti genetiche tra uomini e donne). In questi casi la stima ottenuta per questi strati potrebbe non essere rappresentativa dell'effetto nell'intera popolazione.

Effetti di popolazione

Un'ultima categoria di effetti che possono invalidare le variabili strumentali è relativa agli effetti di popolazione (17).

Stratificazione della popolazione: avviene quando esistono sottogruppi della popolazione che differiscono sia per tassi di malattia che per frequenza degli alleli di interesse. Ciò può provocare associazioni spurie (non libere da confondimento) tra genotipo e malattia nell'intera popolazione in studio.

Effetto di determinazione: se la variante genetica è associata con un criterio di arruolamento nello studio, allora la proporzione relativa di soggetti in ogni sottogrup-

po genetico non seguirà la stessa proporzione identificata nella popolazione generale. Di conseguenza, l'associazione genetica con l'*outcome* individuata in questo campione potrebbe non essere rappresentativa di ciò che accade nella popolazione generale. Questo potrebbe rappresentare un problema negli studi che mirano a valutare associazioni genetiche in popolazioni di individui affetti da malattie. Se ad esempio si vuole condurre un trial clinico arruolando pazienti in prevenzione secondaria per la malattia cardiovascolare, si deve considerare che i soggetti con un maggior rischio di malattia geneticamente determinato hanno meno probabilità di sopravvivere fino al reclutamento nel trial, e quindi la randomizzazione degli individui in sottogruppi genetici al momento del concepimento non sarebbe valida nella popolazione in studio, portando ad associazioni genetiche distorte.

Limiti e vantaggi della tecnica di randomizzazione Mendeliana

Sebbene in alcuni casi non sia possibile dimostrare in maniera conclusiva la validità degli assunti per le variabili strumentali selezionate, diverse tipologie di test e valutazioni possono essere condotte per aumentare o diminuire la confidenza dell'utilizzo di una determinata variante genetica. Tuttavia, una conoscenza biologica, piuttosto che un approccio statistico, dovrebbe costituire la "spina dorsale" di qualsiasi giustificazione dell'uso di una particolare variante genetica come variabile strumentale in questa tipologia di disegno di studio. Ne consegue che è necessario prestare la dovuta attenzione all'interpretazione dei risultati di studi di RM a seconda della plausibilità degli assunti (18,19). Sotto l'assunto che la variante genetica è un valido strumento, gli studi di RM possono rispon-

dere a due importanti quesiti riguardanti un possibile effetto causale dell'esposizione sull'*outcome* ed, eventualmente, informarci sulla dimensione dell'effetto. La randomizzazione Mendeliana, infatti, viene ad oggi considerata una delle prospettive più promettenti per migliorare la comprensione della causalità negli studi basati sulla popolazione, sebbene vi siano delle limitazioni che devono essere prese in considerazione. Ad esempio, con questa metodologia è possibile solo esaminare aree per cui esistono varianti e polimorfismi funzionali (o marcatori genetici legati a tali polimorfismi funzionali) che siano rilevanti per l'esposizione modificabile di interesse (14, 20). Inoltre, nel contesto degli studi di associazione genetica più in generale, è stato sottolineato che, in molti casi, anche se un *locus* è coinvolto in un processo metabolico correlato alla malattia, potrebbe non esserci un marcatore adatto o un polimorfismo funzionale per consentire lo studio di questo processo (21). Recentemente, comunque, la riduzione dei costi di genotipizzazione e il conseguente aumento degli studi di associazione su tutto il genoma (studi GWAS) hanno facilitato la scoperta di un numero considerevole di nuove varianti genetiche associate a fattori di rischio e *outcome* di malattia (22). Infine, nonostante l'analogia tra studio di RM e trial randomizzato abbia creato un grande interesse nell'uso di questo disegno di studio per anticipare i risultati attesi dagli studi clinici randomizzati stessi, tale analogia presenta essa stessa delle limitazioni. Se da un lato gli studi di RM infatti valutano l'effetto di cambiamenti geneticamente determinati (che perciò durano da tutta la vita) di un'esposizione su un *outcome*, gli studi clinici randomizzati valutano l'effetto di cambiamenti a breve termine e terapeuticamente indotti. La sfida diventa quindi quella di tradurre l'effetto causale di cambiamenti permanen-

ti di un'esposizione (effetto mendeliano) nell'effetto che ci si può attendere in risposta a cambiamenti terapeutici nel breve termine (effetto clinico) (23). Sfortunatamente, questo in uno studio di RM non è sempre realizzabile, dato che spesso l'effetto delle esposizioni genetiche sembra avere effetti cumulativi nel tempo sull'*outcome* associato, con una conseguente sovrastima delle dimensioni dell'effetto atteso rispetto a quanto si potrebbe osservare nella pratica clinica. Nonostante questa limitazione di cui è importante tenere conto, la RM può comunque essere utilizzata per predire in maniera accurata i risultati di studi clinici randomizzati (24,25), confrontando l'effetto di una variante di riferimento che mima una terapia che è stata valutata in studi randomizzati, e stimando il cambiamento che deve essere indotto nell'esposizione per determinare un beneficio nell'*outcome* valutato in un trial randomizzato a breve termine (23).

Applicazione della randomizzazione Mendeliana in ambito di dislipidemie

Solo di recente la ricerca in ambito cardiovascolare ha beneficiato dell'implementazione di studi di RM, i quali hanno avuto un ruolo fondamentale nel confermare molte associazioni causali tra diversi fattori di rischio e alcune patologie. Nella maggior parte dei casi, l'associazione tra questi fattori e le malattie era ben nota e derivata da studi clinici e osservazionali, ma la possibile presenza di distorsione, specialmente in quest'ultimi, ha impedito di stabilire con certezza i meccanismi causali. Nell'ambito delle dislipidemie, di seguito sono riassunti i risultati di alcuni studi di RM (26).

Colesterolo LDL

Negli ultimi anni, numerosi studi di RM hanno stabilito con fermezza la relazione

causale tra il colesterolo LDL (LDL-C) e il rischio di malattia coronarica acuta (CAD). In molti di questi studi le evidenze ottenute, circa la riduzione dei livelli di LDL-C, sono risultate consistenti con quanto supportato dagli studi clinici randomizzati (25, 27). Da un punto di vista clinico, la riduzione dei livelli di LDL-C dovuta a varianti in geni regolatori del metabolismo lipidico sembra essere inferiore a quanto atteso; tuttavia, la riduzione del rischio di CAD risulta paragonabile a quanto osservato clinicamente in seguito al trattamento con statine, suggerendo un beneficio derivante da un'esposizione permanente a bassi livelli di LDL-C, determinata da un particolare genotipo (27, 28).

Evidenze simili si sono riscontrate per un altro farmaco ipolipemizzante. Ezetimibe è un inibitore dell'assorbimento del colesterolo che agisce a livello dell'intestino tenue, con un meccanismo di inibizione dell'attività della proteina NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like 1) che comporta un abbassamento dei livelli di LDL-C. Alcune analisi di RM hanno identificato delle variazioni polimorfiche sul gene NPC1L1 che si associano ai livelli sierici di LDL-C e rischio di CAD (24, 29).

L'inibizione di PCSK9 attraverso anticorpi monoclonali si è dimostrata efficace nel ridurre notevolmente gli eventi cardiovascolari (30, 31). Un'analisi fattoriale 2x2 di RM sul gene PCSK9 (proteina convertasi subtilisina/Kexin tipo 9) ha evidenziato un'associazione log-lineare, dose-dipendente, tra l'abbassamento dei livelli di LDL-C mediato da PCSK9 e il rischio di infarto miocardico o morte per CAD (25). Sulla base delle evidenze ottenute da studi di RM, non è però possibile trarre conclusioni in merito ad una maggiore efficacia nel ridurre i livelli di LDL-C degli inibitori di PCSK9 rispetto alle statine. Ad oggi, non esiste un confronto

diretto tra inibitori di PCSK9 e statine in studi clinici. Due recenti studi [FOURIER (31) e ODYSSEY (32)] hanno valutato l'efficacia degli inibitori di PCSK9 in popolazioni ad alto rischio cardiovascolare, riportando una marcata riduzione degli eventi cardiovascolari quando questi venivano usati in combinazione con statine, rispetto alla monoterapia statinica. In questi studi, gli inibitori di PCSK9 e le statine possono aver manifestato un'azione sinergica nel ridurre i livelli di LDL-C attraverso due meccanismi biologici diversi: i primi aumentando il riciclo dei recettori delle LDL e, quindi, il numero di recettori presenti sulla superficie degli epatociti; le statine bloccando il percorso di sintesi del colesterolo nel fegato attraverso l'inibizione della 3-idrossi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) reduttasi.

Più recentemente, studi di RM hanno portato alla luce alcune delle più importanti evidenze scientifiche in ambito cardiovascolare. Nel 2015, un ampio studio ha scoperto che la riduzione dei livelli di LDL-C con ezetimibe o con statine (in monoterapia o in combinazione con ezetimibe) dovrebbe comportare una diminuzione del rischio di malattia coronarica comparabile tra le due terapie, in termini di entità del beneficio ottenuto per ogni riduzione di un'unità di LDL-C; l'entità del beneficio clinico osservato risultava inoltre essere proporzionale alla riduzione assoluta dei livelli di LDL-C, indipendentemente dal trattamento utilizzato, o in altre parole, l'effetto della riduzione dei livelli di LDL-C sul rischio di CAD sembra essere determinato dall'esposizione assoluta (in termini di tempo) a bassi livelli, indipendentemente dal meccanismo con cui il colesterolo LDL viene ridotto. Questo, fornisce prove a sostegno del concetto "*lower is better, earlier is better*" (24, 33).

In aggiunta, uno studio che ha valutato

l'associazione di due *score* genetici, costruiti rispettivamente sulla base di varianti su geni regolatori del metabolismo dei trigliceridi (gene LPL) e delle LDL (gene LDLR), con il rischio di eventi cardiovascolari, ha mostrato che le varianti associate ad una riduzione dei livelli di trigliceridi e quelle associate ad una riduzione dei livelli di LDL-C erano associate ad una riduzione di rischio paragonabile per ogni unità di lipoproteine contenenti Apolipoproteina B (ApoB). La riduzione del rischio cardiovascolare sembra quindi essere indipendente, additiva e proporzionale alla variazione assoluta dei livelli di ApoB; in altre parole il beneficio clinico derivante dall'abbassamento dei livelli di trigliceridi è simile a quello ottenibile dalla riduzione dei livelli di LDL-C per ogni variazione unitaria nei livelli di ApoB (34).

Nel loro insieme, i risultati ottenuti dagli studi di RM hanno confermato quanto osservato clinicamente in studi randomizzati sull'associazione causale tra livelli sierici di LDL-C e rischio di CAD. Questa consistenza nelle evidenze ha anche dimostrato che l'approccio di RM può essere utilizzato per anticipare accuratamente i risultati di studi randomizzati, e convalidare nuovi target farmacologici.

Colesterolo HDL

Gli effetti pleiotropici di alcune varianti implicate nel metabolismo lipidico hanno reso difficile stabilire un ruolo causale per il colesterolo contenuto nelle lipoproteine ad alta densità (HDL-C) che fosse indipendente dagli effetti dei livelli del colesterolo LDL o dei trigliceridi, sebbene studi epidemiologici e metanalisi abbiano costantemente riportato un'associazione inversa tra livelli di HDL-C e rischio di CAD (26). Evidenze estrapolate da cinque studi di RM hanno uniformemente mostrato che alterazioni geneticamente definite dei livelli di HDL-C non risultano predittive del ri-

schio di CAD (35-39). Tuttavia, vi sono d'altro canto osservazioni da RM che confermano la natura protettiva di HDL-C per la malattia cardiovascolare, indipendentemente dall'effetto di LDL-C e trigliceridi (40). Diversamente da precedenti tre inibitori della proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CETP) (torcetrapib, dalcetrapib ed evacetrapib) valutati in ampi studi clinici randomizzati, per i quali non è stata osservata una riduzione del rischio cardiovascolare in seguito all'aumento dei livelli di HDL-C, il recente studio REVEAL ha dimostrato che l'uso di anacetrapib, il più recente inibitore del CETP, in pazienti con aterosclerosi che stavano ricevendo una terapia con statine ad alta intensità, ha comportato un'incidenza minore di eventi coronarici maggiori (41). Tuttavia, è ancora in discussione se l'effetto protettivo osservato possa essere attribuibile all'aumento dei livelli di HDL-C.

Rispetto al colesterolo LDL, il metabolismo e la biologia del colesterolo HDL sono molto più complessi. I livelli di HDL-C forniscono informazioni solo sulla concentrazione sierica, ma non sulle caratteristiche funzionali delle particelle di HDL, come ad esempio sul potenziale efflusso di colesterolo o sulla funzione antinfiammatoria. Pertanto, ulteriori evidenze sulla funzione del colesterolo HDL possono aiutare a identificare nuovi *pathways* genomici che possono fornire nuove strategie terapeutiche per la cura dell'aterosclerosi.

Trigliceridi

Le evidenze ottenute da studi di RM sugli effetti dei trigliceridi (TG) e delle lipoproteine ricche in TG sul rischio di aterosclerosi sono state contrastanti per molto tempo. In due analisi di RM multivariate è stato suggerito un deleterio effetto causale dell'aumento dei trigliceridi sul rischio di malattia coronarica (40, 42). Tuttavia, vi è

poca coerenza nelle associazioni delle singole varianti correlate ai trigliceridi con il rischio cardiovascolare (43), con alcune di queste fortemente associate al rischio di malattia e altre che non mostrano alcuna chiara relazione (44, 45). Successivamente, un altro studio di RM ha riportato che concentrazioni plasmatiche geneticamente ridotte di TG misurate non a digiuno erano associate ad una ridotta mortalità per tutte le cause (46). Utilizzando score poligenici, anche una metanalisi di studi di RM ha uniformemente supportato un effetto causale dei TG sul rischio di CAD (36). Tuttavia, evidenze da un altro studio, dove è stato implementato un metodo di regressione multipla ponderato, ha recentemente dimostrato che il rischio di CAD viene completamente spiegato dai livelli sierici del colesterolo non-HDL, con nessuna associazione con quella del colesterolo HDL e dei TG (47). Utilizzando questo approccio, la rianalisi dei dati di Do et al. (42) non ha più supportato un effetto indipendente dei livelli di TG sul rischio di CAD.

Una fenotipizzazione più dettagliata, come la profilazione delle sottoclassi delle lipoproteine, risulta quindi necessaria per capire la validità degli strumenti genetici utilizzati negli studi di RM per valutare la causalità dei livelli di TG sul rischio cardiovascolare, soprattutto in virtù del fatto che i *remnants* del colesterolo, definiti anche come il colesterolo trasportato nelle particelle di lipoproteine a bassissima densità (VLDL) ricche in TG e nelle lipoproteine a densità intermedia (IDL) insieme ai chilomicroni in condizioni di non digiuno, sono stati recentemente identificati come un fattore di rischio causativo per aterosclerosi (48).

Lipoproteina (a)

Il ruolo della lipoproteina (a) (Lp(a)) nella stima del rischio cardiovascolare è stato e continua ad essere oggetto di dibattito.

La Lp(a) è una particella simile alle LDL che può favorire la formazione di macrofagi e cellule muscolari lisce infarcite di lipidi derivati dalla fagocitosi delle LDL modificate e la deposizione di colesterolo nelle placche, e per questo risulta associata a CAD. A causa della mancanza di farmaci specifici, non è ancora stato disegnato uno studio clinico randomizzato per verificare l'efficacia della riduzione dei livelli di Lp(a), anche se alcune terapie come niacina, anacetrapib ed evolocumab sono in grado di determinare una moderata diminuzione dei livelli sierici. Da un punto di vista genetico, vi sono invece alcune evidenze che potrebbero far presupporre un'associazione causale con la malattia cardiovascolare. Uno studio di RM effettuato su partecipanti europei, ha mostrato che livelli elevati di Lp(a) risultano associati ad un aumento del rischio di infarto miocardico, sia che questi siano determinati da un punto di vista genetico (aumento del rischio del 22%), sia che si valuti l'aumento plasmatico in maniera osservazionale (aumento significativo del rischio dell'8%) (49). Infine, in un altro studio genetico, è emerso un aumento del rischio di malattia cardiovascolare all'aumentare dei livelli di uno score genetico, costruito includendo due varianti utilizzate per approssimare i livelli plasmatici di Lp(a) (50). Queste evidenze hanno aumentato la probabilità che il *pathway* che coinvolge Lp(a) sia causalmente rilevante per le malattie cardiovascolari.

Altri biomarcatori valutati attraverso studi di randomizzazione Mendeliana

Diversi studi di RM sono stati implementati per valutare la rilevanza causale anche di altri numerosi biomarcatori. Partendo da evidenze di studi genetici umani, la tecnica della RM ha confutato la rilevanza causale di alcuni marcatori, tra cui la proteina C reattiva, il fibrinogeno, l'acido urico, l'attività della fosfolipasi A2 associata

alla lipoproteina e l'omocisteina. Al contrario, altri studi di RM hanno invece fornito evidenze sulla rilevanza causale di altri *pathway* nella malattia coronarica, incluso il recettore dell'interleuchina-6 (51).

Prospettive future

Uno studio randomizzato controllato è un *setting* sperimentale in cui vengono te-

state semplici ipotesi predefinite - l'efficacia di interventi mirati sull'uomo. Al contrario, uno studio di RM non presuppone un *setting* sperimentale, ma richiede che il *setting* determinato al concepimento rimanga tale quando i dati sull'esposizione e sulla malattia vengono raccolti. Questo è equivalente a supporre che le relazioni tra il gene e l'esposizione, tra il gene e la malattia e tra l'esposizione e la malattia siano

Glossario

Trial controllato e randomizzato (Randomized Controlled Trial, RCT): Disegno di studio nel quale le condizioni dello studio sono "manipolate" dal ricercatore. I soggetti nei gruppi di studio vengono assegnati al trattamento di interesse in maniera casuale attraverso la randomizzazione. Al gruppo di controllo dello studio viene prescritto un trattamento di cui si conosce l'effetto, oppure nessun trattamento. Il RCT condotto in maniera metodologicamente corretta è considerato al vertice della cosiddetta "gerarchia delle prove di efficacia", secondo solo alla revisione sistematica.

Randomizzazione: Metodo di assegnazione casuale dei pazienti al braccio sperimentale o al braccio di controllo; usato negli studi clinici randomizzati per evitare che i risultati siano falsati da fattori soggettivi o comunque interferenti.

Studio osservazionale: Disegno di studio nel quale si tende a dimostrare i possibili effetti di vari fattori di rischio o protettivi, su un gruppo di persone, osservando gli eventi che si verificano senza alcun intervento da parte dello sperimentatore.

Randomizzazione Mendeliana: Metodo che utilizza le informazioni genetiche (ereditate sin dal concepimento e non modificabili) per determinare le relazioni causali tra fattori di rischio ed esiti della malattia in studi osservazionali.

Variabile strumentale: In statistica, econometria, epidemiologia e discipline correlate, il metodo delle variabili strumentali (*Instrumental Variables, IV*) viene utilizzato per stimare le relazioni causali quando esperimenti controllati non sono realizzabili. In questa rassegna è intesa come variabile associata al fattore di rischio di interesse, non correlata ad altri fattori di confondimento, associata all'esito (*outcome*) solo attraverso il fattore di rischio.

Variabile strumentale debole: Può verificarsi negli studi di randomizzazione Mendeliana quando si utilizzano una o più varianti genetiche che spieghino solo una piccola parte della variabilità del fattore di rischio, unita a una ridotta dimensione del campione.

Cromosoma: Struttura composta di DNA e proteine che porta gran parte dell'informazione genetica cellulare.

Locus: Una specifica regione di un cromosoma. Può essere considerato sinonimo di gene.

Gene: Unità ereditaria.

Allele: Forma alternativa di un particolare carattere genetico, situato in corrispondenza di un particolare *locus* del cromosoma.

Genotipo: La descrizione esatta della costituzione genetica di un individuo per quanto riguarda un singolo carattere oppure un insieme più grande di caratteri.

Linkage disequilibrium: Si riferisce ad un'associazione statistica (o correlazione) tra polimorfismi genetici, di solito perché sono posizionati vicini sul gene.

Pleiotropia: Effetti delle varianti genetiche su più di un sistema biologico (una variante genetica può avere funzioni multiple, portando ad una stima errata del rapporto causa-effetto).

Canalizzazione: Adattamento biologico compensativo degli effetti sul rischio di malattia.

Stratificazione della popolazione: Confondimento dell'associazione gene-malattia per appartenenza etnica; frequenze alleliche, tassi di malattia o di esposizione possono essere molto differenti e variabili tra diversi sottogruppi della popolazione e ciò può portare ad associazioni spurie.

Questionario di auto-apprendimento

1. L'approccio della randomizzazione Mendeliana rappresenta:

- a) Un tentativo di introduzione dello schema di randomizzazione in un contesto sperimentale.
- b) Un tentativo di introduzione dello schema di randomizzazione in un contesto osservazionale.
- c) Un tentativo di introduzione dello schema di randomizzazione sia in un contesto sperimentale che in quello osservazionale.

2. I principali vantaggi che derivano dalla randomizzazione Mendeliana sono:

- a) L'associazione tra polimorfismo e malattia può mimare l'associazione tra una data esposizione e la malattia stessa, eliminando totalmente il problema di causalità inversa oltre che altri tipi di confondimento.
- b) L'associazione tra polimorfismo e malattia può mimare l'associazione tra una data esposizione e la malattia stessa, ma non può eliminare il problema di causalità inversa o l'effetto di altri tipi di confondimento.
- c) L'associazione tra polimorfismo e malattia può mimare l'associazione tra una data esposizione e la malattia stessa, eliminando però solo parzialmente il problema di causalità inversa oltre che l'impatto di altri tipi di confondimento.

3. Gli studi di randomizzazione Mendeliana permettono:

- a) Di estendere il rischio stimato ad una vita intera, o più in generale di confermare la tendenza del rischio oltre gli anni considerati dallo studio di coorte.
- b) Di confermare la tendenza del rischio oltre gli anni considerati dallo studio di coorte, ma anche di stimare in maniera consistente il rischio di malattia nel breve termine.
- c) Di stimare in maniera consistente il rischio di malattia nel breve termine.

4. Sebbene la randomizzazione Mendeliana apra nuove prospettive, la sua applicazione richiede che vengano rispettati alcuni assunti fondamentali. In particolare, è necessario accertare che:

- a) Vi sia una differente prevalenza dell'allele di rischio all'interno della popolazione; il polimorfismo non sia in *Linkage Disequilibrium* con un'altra variante in grado di influenzare il rischio di malattia e che non sia pleiotropico; sia ben nota la funzione del gene in esame e la sua relazione con la malattia si basi su un valido assunto biologico.
- b) Vi sia una differente prevalenza dell'allele di rischio all'interno della popolazione; il polimorfismo non sia in *Linkage Disequilibrium* con un'altra variante in grado di influenzare il rischio di malattia e che non sia pleiotropico.
- c) Non vi sia una differente prevalenza dell'allele di rischio all'interno della popolazione; il polimorfismo non sia in *Linkage Disequilibrium* con un'altra variante in grado di influenzare il rischio di malattia e che non sia pleiotropico; sia ben nota la funzione del gene in esame e la sua relazione con la malattia si basi su un valido assunto biologico.

5. Gli studi di randomizzazione Mendeliana:

- a) Sebbene siano caratterizzati da una forte validità interna difficilmente possono apportare un importante contributo all'epidemiologia osservazionale data la bassa generalizzabilità dei risultati all'intera popolazione.
- b) Sebbene siano caratterizzati da una bassa validità interna, rappresentano un approccio fondamentale per la ricerca clinica e per lo sviluppo terapeutico.
- c) Rappresentano essenziali elementi di supporto per il disegno di nuovi trial clinici randomizzati, per la stesura di linee-guida per la pratica clinica e per l'implementazione delle *policies* e delle misure di sanità pubblica, data la loro validità sia interna che esterna.

Risposte corrette:
1B, 2A, 3A, 4C, 5C

tutte correttamente specificate, permettendo di stabilire una vera relazione di causalità. Pertanto, benché sia necessaria molta cautela nell'interpretare correttamente gli studi che utilizzano la tecnica della randomizzazione Mendeliana, essi possono apportare un importante contributo all'epidemiologia osservazionale, quando svolti con adeguata attenzione alla progettazione dello studio, con uso appropriato dei metodi statistici, e se basati su chiare evidenze circa gli assunti sottesi alle inferenze di causalità.

Inoltre, il continuo sviluppo e i progressi relativi alle tecnologie associate alle discipline "omics", insieme al perfezionamento degli attuali metodi statistici, fanno di questo approccio uno strumento fondamentale per la ricerca clinica e lo sviluppo terapeutico. Di conseguenza, questi studi diventano essenziali elementi

di supporto per il disegno di nuovi trial clinici randomizzati, per la stesura di linee-guida per la pratica clinica e per l'implementazione delle *policies* e delle misure di sanità pubblica. Questo in particolare è vero per l'ambito cardiovascolare dove, sebbene siano stati raggiunti traguardi importanti per il trattamento della malattia cardiovascolare, questa patologia rimane tra le principali cause di morte a livello globale.

L'utilizzo della genomica per identificare la vulnerabilità individuale è un'area di ricerca attiva che può rappresentare una strategia pratica non solo per personalizzare la prevenzione e il trattamento della malattia cardiovascolare (medicina di precisione), ma anche per individuare target farmacologici promettenti e, di conseguenza, per informare adeguatamente la scoperta e lo sviluppo di nuove terapie.

RIASSUNTO

Diversi approcci sono stati implementati per superare i limiti che, tipicamente e in modo diverso, influenzano sia gli studi clinici randomizzati e che gli studi osservazionali. Gli studi di randomizzazione Mendeliana, in cui varianti genetiche funzionali servono da strumenti ("variabili strumentali") per approssimare esposizioni ambientali modificabili, sono stati sviluppati e implementati nell'ambito di studi epidemiologici osservazionali per rafforzare le stime inferenziali causali in situazioni non sperimentali. Poiché le varianti genetiche vengono trasferite casualmente dai genitori alla prole al momento della formazione del gamete, queste possono realisticamente imitare il processo di allocazione casuale del trattamento in uno studio clinico randomizzato, offrendo una strategia per eliminare, o comunque ridurre, il confondimento residuo tipico degli studi osservazionali, permettendo quindi di ottenere risultati generalizzabili all'intera popolazione. Se condotti correttamente e interpretati attentamente, gli studi di randomizzazione Mendeliana possono fornire evidenze scientifiche utili a supporto o rifiuto di ipotesi causali che verificano l'associazione tra esposizioni ambientali e malattie. Queste evidenze possono rappresentare informazioni utili per identificare nuovi potenziali bersagli farmacologici, con una probabilità di successo superiore rispetto ad approcci basati su studi sugli animali o *in vitro*.

Questa rassegna riassume la storia e il contesto della randomizzazione Mendeliana, le caratteristiche principali del disegno di studio, gli assunti per un utilizzo corretto, e una breve discussione sui vantaggi e svantaggi di questo approccio. Viene, inoltre, presentata anche una panoramica di quali sono state le applicazioni fino ad oggi della randomizzazione Mendeliana in ambito di dislipidemie.

Parole chiave: *Epidemiologia Genetica; Randomizzazione Mendeliana; Variante Genetica; Variabile Strumentale; Inferenza Causale; Malattie Cardiovascolari.*

Bibliografia

1. Kaprio J. Genetic epidemiology. *BMJ*. 2000; 320: 1257.
2. Ebrahim S, Smith GD. Mendelian randomization: can genetic epidemiology help redress the failures of observational epidemiology? *Hum Genet*. 2008; 123: 15-33.
3. Meldrum ML. A brief history of the randomized controlled trial. From oranges and lemons to the gold standard. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2000; 14: 745-60.
4. Boyko EJ. Observational Research Opportunities and Limitations. *J Diabetes Complications*. 2013; 27: 10.1016.
5. Burgess S, Foley CN, Zuber V. Inferring Causal Relationships Between Risk Factors and Outcomes from Genome-Wide Association Study Data. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2018; 19: 303-327.
6. Smith GD, Ebrahim S. 'Mendelian randomization': can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? *Int J Epidemiol*. 2003; 32: 1-22.
7. Katan MB. Apolipoprotein E isoforms, serum cholesterol, and cancer. *Lancet*. 1986; 1: 507-508.
8. Youngman LD, Keavney BD, Palmer A. Plasma fibrinogen and fibrinogen genotypes in 4685 cases of myocardial infarction and in 6002 controls: test of causality by 'Mendelian randomization'. *Circulation*. 2000; 102 (Suppl. II): 31-32.
9. Thomas DC, Conti DV. Commentary: the concept of 'Mendelian Randomization'. *International Journal of Epidemiology*. 2004; 33: 21-25.
10. Thompson JR, Minelli C, Abrams KR, et al. Meta-analysis of genetic studies using Mendelian randomization - a multivariate approach. *Statistics in Medicine*. 2005; 24: 2241-2254.
11. Bautista LE, Smeeth L, Hingorani AD, Casas JP. Estimation of bias in nongenetic observational studies using 'Mendelian triangulation'. *Annals of Epidemiology*. 2006; 16: 675-680.
12. Thomas DC, Lawlor DA, Thompson JR. Re: estimation of bias in nongenetic observational studies using 'Mendelian triangulation' by Bautista et al. *Annals of Epidemiology*. 2007.
13. Smith GD, Hemani G. Mendelian randomization: genetic anchors for causal inference in epidemiological studies. *Hum Mol Genet*. 2014; 23(R1): R89-R98.
14. Lawlor DA, Harbord RM, Sterne JAC, et al. Mendelian randomization: Using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology. *Statist Med*. 2008; 27: 1133-1163.
15. Smith GD, Ebrahim S. Mendelian Randomization: Genetic Variants as Instruments for Strengthening Causal Inference in Observational Studies. In: Weinstein M, Vaupel JW, Wachter KW, editors. National Research Council (US) Committee on Advances in Collecting and Utilizing Biological Indicators and Genetic Information in Social Science Surveys. 2008; 336-365.
16. Sheehan NA, Didelez V, Burton PR, Tobin MD. Mendelian Randomisation and Causal Inference in Observational Epidemiology. *PLoS Med*. 2008; 5: e177.
17. Burgess S, Thompson SG. Mendelian Randomization: Methods for Using Genetic Variants in Causal Estimation. In: Keiding N, Morgan BJT, Winkle CK, van der Heijden P, editors. *Interdisciplinary Statistics Series*. 2015; 25-40.
18. Nitsch D, Molokhia M, Smeeth L, et al. Limits to causal inference based on Mendelian randomization: a comparison with randomized controlled trials. *Am J Epidemiol*. 2006; 163: 397-403.
19. Bennett DA. An Introduction to Instrumental Variables - Part 2: Mendelian Randomisation. *Neuroepidemiology*. 2010; 35: 307-310.
20. Little J, Khoury MJ. Mendelian randomization: A new spin or real progress? *Lancet*. 2003; 362: 930-931.
21. Weis K, Terwilliger J. How many diseases does it take to map a gene with SNPs? *Nature Genetics*. 2000; 26: 151-157.
22. Palmer TM, Lawlor DA, Harbord RM, et al. Using multiple genetic variants as instrumental variables for modifiable risk factors. *Stat Methods Med Res*. 2012; 21: 223-242.
23. Ference BA. How to use Mendelian randomization to anticipate the results of randomized trials. *European Heart Journal*. 2018; 39: 360-362.
24. Ference BA, Majeed F, Penumetcha R, et al. Effect of naturally random allocation to lower low-density lipoprotein cholesterol on the risk of coronary heart disease mediated by polymorphisms in NPC1L1, HMGCR, or both: a 2x2 factorial Mendelian randomization study. *J Am Coll Cardiol*. 2015; 65: 1552-1561.
25. Ference BA, Robinson J, Brook RD, et al. Variation in PCSK9 and HMGCR and risk of cardiovascular disease and diabetes. *N Engl J Med*. 2016; 375: 2144-2153.
26. Hu Q, Hao P, Liu Q, et al. Mendelian randomization studies on atherosclerotic cardiovascular disease: evidence and limitations. *Sci China Life Sci*. 2019; 62: 758-770.
27. Linsel-Nitschke P, Götz A, Erdmann J, et al. Lifelong reduction of LDL-cholesterol related to a common variant in the LDL-receptor gene decreases the risk of coronary artery disease—a Mendelian randomisation study. *PLoS One*. 2008; 3: e2986.

28. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CNB, et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation*. 2004; 110: 227-239.
29. Polisecki E, Peter I, Simon JS, et al. Genetic variation at the NPC1L1 gene locus, plasma lipoproteins, and heart disease risk in the elderly. *J Lipid Res*. 2010; 51: 1201-1207.
30. Sabatine MS, Giugliano RP, Wiviott SD, et al. Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2015; 372: 1500-1509.
31. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, et al. Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2017; 376: 1713-1722.
32. Schwartz GG, Steg PG, Szarek M, et al. Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med*. 2018; 379: 2097-2107.
33. Ference BA, Yoo W, Alesh I, et al. Effect of long-term exposure to lower lowdensity lipoprotein cholesterol beginning early in life on the risk of coronary heart disease: a Mendelian randomization analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2012; 60: 2631-2639.
34. Ference BA, Kastelein JJP, Ray KK, et al. Association of Triglyceride-Lowering LPL Variants and LDL-C-Lowering LDLR Variants With Risk of Coronary Heart Disease. *JAMA*. 2019; 321: 364-373.
35. Mokry LE, Ahmad O, Forgetta V, et al. Mendelian randomisation applied to drug development in cardiovascular disease: a review. *J Med Genet*. 2015; 52: 71-79.
36. Holmes MV, Asselbergs FW, Palmer TM, et al. Mendelian randomization of blood lipids for coronary heart disease. *Eur Heart J*. 2015; 36: 539-550.
37. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: A mendelian randomisation study. *Lancet*. 2012; 380: 572-580.
38. Wu Z, Lou Y, Qiu X, et al. Association of cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene polymorphism, high density lipoprotein cholesterol and risk of coronary artery disease: a meta-analysis using a Mendelian randomization approach. *BMC Med Genet*. 2014; 15: 118.
39. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Stene MCA, et al. Association of loss-of-function mutations in the ABCA1 gene with high-density lipoprotein cholesterol levels and risk of ischemic heart disease. *JAMA*. 2008; 299: 2524-2532.
40. Burgess S, Freitag DF, Khan H, et al. Using multivariable Mendelian randomization to disentangle the causal effects of lipid fractions. *PLoS One*. 2014; 9: e108891.
41. HPS3/TIMI55-REVEAL Collaborative. Effects of anacetrapib in patients with atherosclerotic vascular disease. *N Engl J Med* 2017; 377: 1217-1227.
42. Do R, Willer CJ, Schmidt EM, et al. Common variants associated with plasma triglycerides and risk for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2013; 45:1345-1352.
43. Rosenson RS, Davidson MH, Hirsh BJ, et al. Genetics and causality of triglyceride-rich lipoproteins in atherosclerotic cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014; 64: 2525-2540.
44. The TG, HDL Working Group of the Exome Sequencing Project. Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. *New England Journal of Medicine*. 2014; 371: 22-31.
45. Do R, Stitzel NO, Won HH, et al. Exome sequencing identifies rare LDLR and APOA5 alleles conferring risk for myocardial infarction. *Nature*. 2014; 518: 102-106.
46. Thomsen M, Varbo A, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Low nonfasting triglycerides and reduced all-cause mortality: a Mendelian randomization study. *Clin Chem*. 2014; 60: 737-746.
47. Helgadóttir A, Gretarsdóttir S, Thorleifsson, et al. Variants with large effects on blood lipids and the role of cholesterol and triglycerides in coronary disease. *Nat Genet*. 2016; 48: 634-639.
48. Würtz P, Kangas AJ, Soininen P, et al. Lipoprotein subclass profiling reveals pleiotropy in the genetic variants of lipid risk factors for coronary heart disease. *J Am College Cardiology*. 2013; 62: 1906-1908.
49. Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Nordestgaard BG. Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction. *JAMA*. 2009; 301: 2331-2339.
50. Clarke R, Peden JF, Hopewell JC, et al. Genetic Variants Associated With Lp(a) Lipoprotein Level and Coronary Disease. *N Engl J Med*. 2009; 361: 2518-28.
51. Zhao W, Lee JJ, Rasheed A, Saleheen D. Using Mendelian Randomization Studies to Assess Causality and Identify New Therapeutic Targets in Cardiovascular Medicine. *Curr Genet Med Rep*. 2016; 4: 207-212.