

APPLICAZIONE DELLA RANDOMIZZAZIONE MENDELIANA ALLO SVILUPPO DEI FARMACI

Mendelian randomization studies applied to drug development

Federica Galimberti^{1,2}

¹Servizio di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari (DiSFeB), Università degli Studi di Milano

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

Keywords

Mendelian randomization
Genetic variant
Instrumental variables
Casual inferences

Abstract

Several efforts and attempts have been made to overcome the limitations that differently affect randomized controlled trials and observational studies. Mendelian randomization approach, in which a functional genetic variants act as instruments (instrumental variables, IV) that proxy for environmentally modifiable exposures, has been developed and implemented within observational epidemiological studies to strengthen causal inferences in non-experimental situations. As the genetic variants are randomly transferred from parent to offspring at the time of gamete formation, they can realistically mimic the treatment allocation process in a randomized clinical study, offering a strategy for eliminating or reducing residual confounding in observational studies. Therefore, if correctly conducted and carefully interpreted, Mendelian randomization studies can provide useful evidence to support or reject causal hypotheses linking environmental exposures to common diseases.

Introduzione

Dall'esigenza di superare i limiti degli studi epidemiologici osservazionali da una parte e degli studi randomizzati controllati dall'altra, nasce l'approccio della randomizzazione Mendeliana.

Una delle finalità dell'epidemiologia genetica è quella di studiare la frequenza, le cause, la distribuzione e il controllo della malattia in relazione ai fattori genetici e di approfondire il ruolo di tali fattori 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, per poter comprendere gli aspetti ereditari delle patologie e la predisposizione individuale a queste, aprendo le porte verso l'era della medicina 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, uomini e anziani che sono sottoposti alla pratica clinico-assistenziale quotidiana, caratterizzati da problemi clinici compositi 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, che da sempre sono considerati il *gold-standard* della ricerca clinica, ovvero il disegno di studio più accurato per rispondere a un determinato quesito diagnostico, relativo la maggior parte delle volte all'efficacia e alla sicurezza di un trattamento farmacologico. Questo tipo di studio infatti si basa sulla tecnica di randomizzazione, per la quale i soggetti reclutati vengono assegnati in modo casuale al gruppo di intervento (soggetti esposti al farmaco) o al gruppo di controllo (soggetti non esposti). Ciò permette di

Corrispondenza: Federica Galimberti, Servizio di Epidemiologia e Farmacologia Preventiva (SEFAP), Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari (DiSFeB), Università degli Studi di Milano, via Balzaretto, 9 - 20133, Milano. E-mail: federica.galimberti@unimi.it

evitare l'influenza dei cosiddetti fattori confondenti, cioè di tutte quelle variabili e condizioni (ad esempio, uso di altri farmaci, stile di vita, fattori ambientali, patologie concomitanti, ecc.) specifiche per ogni individuo che potrebbero impattare e alterare la relazione causale intervento-outcome. Il trial randomizzato controllato quindi consente, al contrario degli studi osservazionali, di distribuire equamente tutti gli altri fattori prognostici tra i due gruppi di pazienti in studio, tra i quali l'unica differenza risulta essere l'intervento somministrato. Dunque, se da una parte i trial clinici randomizzati riescono a tenere conto dell'effetto dei fattori confondenti, dall'altra non sono sempre rappresentativi della popolazione per la quale viene preso in considerazione un intervento. In più, possono incorrere in problematiche, di tipo tecnico-procedurale, economico ed etico per molte esposizioni di rilevanza per la salute pubblica, come tossine, attività fisica o regimi nutrizionali complessi, che ne rendono impossibile la realizzazione pratica.

Per quanto fino ad ora esposto, l'ideale sarebbe 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 il *bias* derivante dall'effetto di fattori confondenti, dall'altro lato studiare questa relazione in un campione eterogeneo che consenta di ottenere risultati generalizzabili all'intera popolazione.

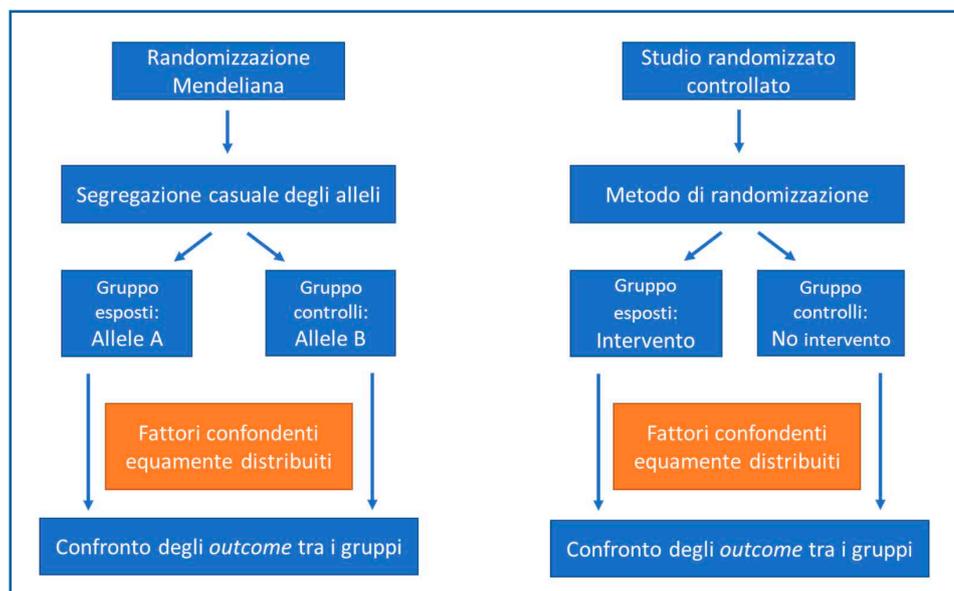
L'approccio della "randomizzazione Mendeliana" fornisce una risposta a questa necessità, rappresentando un tentativo di introduzione dello schema di randomizzazione in uno studio osservazionale. Tale tecnica, infatti, utilizza dati genetici per definire e stimare l'effetto causale di fattori di rischio modificabili (non genetici) basati su dati osservazionali.

L'approccio della randomizzazione Mendeliana

L'approccio della randomizzazione Mendeliana sfrutta il fenomeno biologico dell'ereditarietà e della distribuzione random dei geni per ogni individuo, generando un nuovo disegno di studio epidemiologico.

Il principio della randomizzazione Mendeliana risale ad almeno 30 anni fa [3] ed è stato attribuito a Katan [4], sebbene nel contesto dell'epidemiologia osservazionale tale termine sia stato utilizzato solo verso la fine dello scorso millennio [5]. Thomas e Conti hanno sottolineato che la randomizzazione Mendeliana è un'applicazione del metodo delle variabili strumentali, le quali sono comunemente usate in econometria [6]. L'uso di questo metodo in epidemiologia ha suscitato un forte interesse e ha subito una rapida crescita, con un ampio riconoscimento delle sue potenzialità statistiche [7-9]. Come suggerisce il nome stesso, il concetto di randomizzazione Mendeliana si basa sul principio dell'assortimento indipendente dei caratteri di Mendel (che è ricordato come "il padre della genetica"), secondo il quale i geni parentali vengono trasferiti alla progenie distribuendosi in maniera casuale (*random*, appunto) al momento della

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



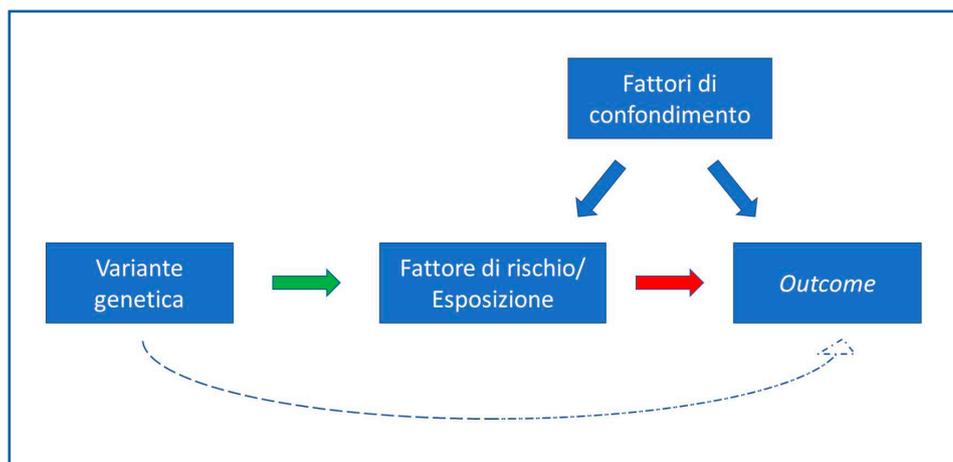
formazione dei gameti. Con questo fenomeno biologico si genera un contesto simile al trial randomizzato controllato, il cosiddetto studio randomizzato controllato “naturale”, in quanto gli individui di una popolazione ereditano casualmente solo un certo allele di un dato genotipo (variante genetica), proprio come i partecipanti a un trial clinico ricevono casualmente il trattamento che viene testato nel trial. Questa variante genetica quindi può essere utilizzata per suddividere i soggetti in gruppi, nei quali le condizioni cliniche, anche quelle più complesse, sono equamente distribuite, proprio come avviene tramite la randomizzazione.

In **Figura 1** è rappresentata l’analogia tra studio di randomizzazione Mendeliana 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 impossibilità di causalità inversa nell’associazione esposizione-outcome (sia nella randomizzazione mendeliana sia nel disegno randomizzato controllato) e sull’importanza dei confronti tra i gruppi definiti dalla variante genetica, indipendentemente dall’associazione tra la variante genetica e l’esposizione in un particolare individuo [10, 11].

Assunti degli studi di randomizzazione Mendeliana e analisi delle variabili strumentali

Nelle analisi di randomizzazione Mendeliana si utilizzano varianti genetiche note come strumento (per questo sono definite variabili strumentali) 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 (**Figura 2**).

Figura 2 Rappresentazione grafica degli assunti di una variabile strumentale.



Più in dettaglio, la variante genetica in studio, che si sa essere associata ad un’esposizione di interesse (freccia verde), 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 (freccia rossa). Perché questa relazione causa-effetto sia valida, è importante e necessario che la variabile strumentale sia associata all’outcome indirettamente (freccia tratteggiata), cioè solo tramite il suo effetto sull’esposizione di interesse [4, 11].

Ricapitolando, affinché una variante genetica sia indicata per stabilire delle inferenze di causalità, deve soddisfare gli assunti fondamentali di una variabile strumentale:

1. ASSUNTO DI RILEVANZA: la variante genetica sia associata in modo causale al fattore di rischio/esposizione di interesse;
2. ASSUNTO DI INDIPENDENZA: i fattori confondenti che intervengono nell’associazione fattore di rischio-outcome non siano correlati in alcun modo alla variante genetica;
3. ASSUNTO DI RESTRIZIONE DI ESCLUSIONE: la variante genetica sia associata all’outcome solo e soltanto tramite il suo effetto sul fattore di rischio.

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

Né il primo né il terzo assunto possono essere testati a livello statistico, dal momento che dipendono da fattori di confondimento che, per definizione, non possono essere osservati e misurati [12].

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, che è differente da variabile strumentale non valida. Si può ancora effettuare un'analisi valida, ma il potere di predizione di un vero effetto causale risulterà essere 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 significa che la variante genetica non è direttamente associata con l'outcome, e che non ci sono altri *pathway* alternativi all'esposizione, attraverso i quali la variante possa essere associata all'outcome [13].

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" (*lifelong exposure*) al fattore di rischio ha sull'outcome, in maniera analoga ad un trial randomizzato a lungo termine.

Applicazione della randomizzazione Mendeliana allo studio di farmaci

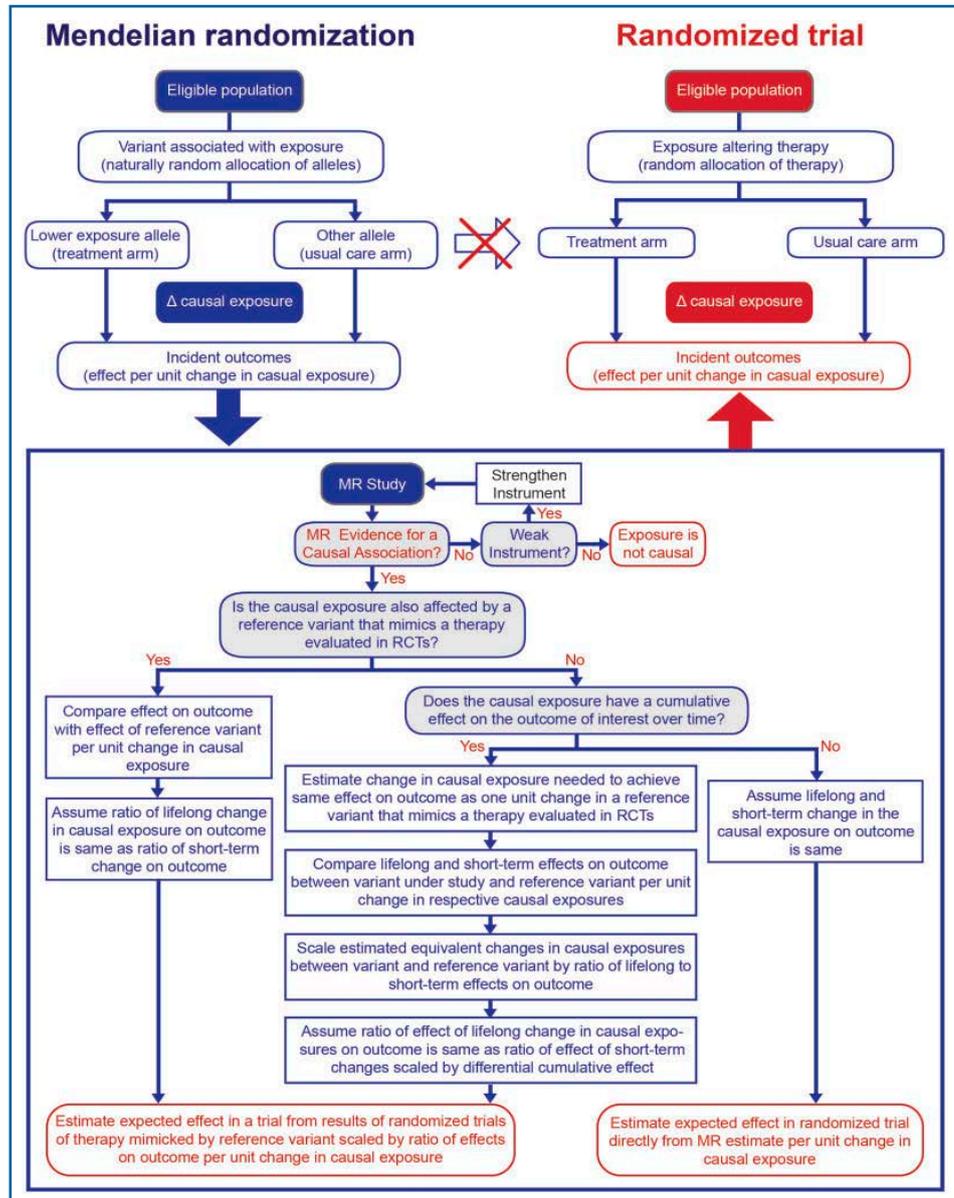
I risultati degli studi di randomizzazione Mendeliana, se ben interpretati, possono predire i risultati di studi clinici in modo accurato.

L'analogia tra studio di randomizzazione Mendeliana e trial randomizzato ha creato un grande interesse nell'uso di questo disegno di studio per anticipare i risultati attesi dagli studi clinici randomizzati stessi. Tuttavia, tale analogia presenta delle limitazioni. Gli studi di randomizzazione Mendeliana infatti valutano l'effetto di cambiamenti geneticamente determinati, che perciò durano da tutta la vita, di un'esposizione su un outcome, mentre gli studi randomizzati valutano l'effetto di cambiamenti, a breve termine e terapeuticamente indotti, della stessa esposizione. La sfida quando si tenta di utilizzare la randomizzazione Mendeliana per anticipare i risultati di studi randomizzati è quindi quella di tradurre l'effetto causale di cambiamenti permanenti di un'esposizione nell'effetto che ci si può attendere in risposta a cambiamenti terapeutici a breve termine di quella esposizione sul risultato di interesse [14].

Sfortunatamente, spesso i risultati di uno studio di randomizzazione Mendeliana non possono essere utilizzati per stimare direttamente l'effetto atteso di una terapia in uno studio a breve termine. Questo perché l'effetto della maggior parte delle esposizioni sembra avere effetti cumulativi nel tempo sull'outcome associato. Ad esempio, durante il trattamento con una statina, un'esposizione *lifelong* a livelli inferiori di colesterolo LDL (C-LDL) è associata a una riduzione circa tre volte maggiore del rischio di eventi cardiovascolari, per unità di variazione dei livelli di C-LDL, rispetto alla riduzione a breve termine di C-LDL [15]. Pertanto, utilizzando i risultati di uno studio di randomizzazione Mendeliana per anticipare direttamente i risultati di uno studio randomizzato, in generale si otterrà una sovrastima delle dimensioni dell'effetto atteso.

D'altra parte, in alcuni casi, la randomizzazione Mendeliana può essere utilizzata per predire i risultati di studi clinici randomizzati [16, 17], confrontando l'effetto di una variante di interesse con l'effetto di una variante di riferimento che mimi una terapia che è stata valutata in studi randomizzati. Purtroppo, la scoperta che un'esposizione sia causalmente associata ad un outcome non è sufficiente per dire se una terapia diretta contro tale esposizione migliorerà l'outcome in uno studio clinico randomizzato. Per anticipare i risultati di uno studio randomizzato, la domanda cruciale che deve essere risolta riguarda la misura in cui l'esposizione causale deve essere modificata per migliorare l'outcome associato in uno studio randomizzato a breve termine. Recentemente, sono stati sviluppati degli algoritmi (un esempio è riportato in **Figura 3**) che se ben applicati dovrebbero aiutare a rispondere a questa domanda critica e, quindi, a migliorare la precisione con cui gli studi di randomizzazione Mendeliana possano essere utilizzati per anticipare i risultati di studi randomizzati [14].

Figura 3 Esempio di algoritmo che sfrutta gli studi di randomizzazione Mendeliana (*Mendelian Randomization*, MR) per anticipare i risultati di studi controllati randomizzati (*Randomized Controlled Trials*, RCT).



Problemi e limiti degli studi di randomizzazione Mendeliana

La randomizzazione Mendeliana viene ad oggi considerata una delle metodiche più promettenti per migliorare la comprensione della causalità negli studi basati sulla popolazione. Vi sono, tuttavia, alcuni limiti potenziali all'applicazione di questa metodologia [10, 18].

Mancanza di varianti genetiche idonee come proxy per l'esposizione di interesse

Pur essendo una tecnica molto promettente, la randomizzazione Mendeliana non è esente da alcuni limiti che vanno tenuti bene in considerazione durante la sua applicazione.

Un'ovvia limitazione della randomizzazione Mendeliana è che può 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. 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 [19]. 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 [20].

Confondimento del genotipo: associazioni tra fattori di rischio modificabili e outcome

Come ampiamente discusso in precedenza, il potere della randomizzazione Mendeliana risiede nella sua capacità di evitare il confondimento spesso sostanziale osservato nell'epidemiologia classica. Tuttavia, in alcuni casi il confondimento può essere reintrodotta negli studi di randomizzazione Mendeliana (**Box 1**) e deve essere appropriatamente considerato quando si interpretano i risultati delle analisi [21, 22].

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.

LINKAGE DISEQUILIBRIUM. È possibile che il *locus* sul cromosoma in studio sia in *linkage disequilibrium* con un altro *locus* polimorfico. 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. Date le distanze fisiche relativamente brevi in cui si osserva il *linkage disequilibrium* nel genoma umano, può sembrare improbabile, ma non lo è, che un polimorfismo che influenza, ad esempio, il rischio di malattia coronarica sia associato a un altro polimorfismo che influenza lo stesso rischio di malattia coronarica, provocando quindi confondimento.

PLEIOTROPIA E MULTIFUNZIONALITÀ DEI GENI. La randomizzazione Mendeliana è molto utile quando può essere usata per correlare una singola esposizione con un outcome di malattia. Tuttavia, i singoli polimorfismi possono influenzare più di un'esposizione, e questo può significare che essi rappresentano una *proxy* per più di un fattore di rischio modificabile, i quali a loro volta possono avere effetto sull'outcome di interesse. Se non viene studiata in modo approfondito la variante genetica e il suo effetto sull'esposizione, gli effetti pleiotropici possono rappresentare un problema, in quanto viene invalidato uno degli assunti fondamentali per le variabili strumentali.

CANALIZZAZIONE. Estremamente importante è che esista una relazione stretta tra variata genetica ed esposizione in modo tale da poter stimare gli effetti di quest'ultima sull'outcome. Ciò richiede che non avvengano fenomeni quali la canalizzazione o adattamento biologico. La canalizzazione 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.

Box 1 Limitazioni di tipo genetico negli studi di randomizzazione Mendeliana.

- 1) *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.
- 2) *Linkage disequilibrium:* si riferisce ad un'associazione statistica (o correlazione) tra polimorfismi genetici, di solito perché sono posizionati vicini sul gene.
- 3) *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).
- 4) *Canalizzazione:* adattamento biologico compensativo degli effetti sul rischio di malattia.

Conclusioni

Uno studio randomizzato controllato è un *setting* sperimentale in cui vengono testate semplici ipotesi predefinite - l'efficacia di interventi mirati sull'uomo. Al contrario, uno studio di randomizzazione Mendeliana 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 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 diventeranno 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.

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] Smith GD, Ebrahim S. ‘Mendelian randomization’: can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? *Int J Epidemiol* 2003; 32: 1-22.
- [4] Katan MB. Apolipoprotein E isoforms, serum cholesterol, and cancer. *Lancet* 1986; 1: 507-8.
- [5] 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.
- [6] Thomas DC, Conti DV. Commentary: the concept of ‘Mendelian Randomization’. *International Journal of Epidemiology* 2004; 33: 21-25.
- [7] Thompson JR, Minelli C, Abrams KR, Tobin MD, Riley RD. Meta-analysis of genetic studies using Mendelian randomization—a multivariate approach. *Statistics in Medicine* 2005; 24: 2241-54.
- [8] Bautista LE, Smeeth L, Hingorani AD, Casas JP. Estimation of bias in nongenetic observational studies using ‘Mendelian triangulation’. *Annals of Epidemiology* 2006; 16: 675-80.
- [9] 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.
- [10] Lawlor DA, Harbord RM, Sterne JAC, Timpson N, Smith GD, Mendelian randomization: Using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology. *Statist Med.* 2008; 27: 1133-63.
- [11] 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; 336-65.
- [12] Sheehan NA, Didelez V, Burton PR, Tobin MD. Mendelian Randomisation and Causal Inference in Observational Epidemiology. *PLoS Med* 2008; 5(8): e177.
- [13] 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.
- [14] Ference BA. How to use Mendelian randomization to anticipate the results of randomized trials, *European Heart Journal* 2018; 39: 360-2.
- [15] Ference BA, Yoo W, Alesh I, Mahajan N, Mirowska KK, Mewada A, Kahn J, Afonso L, Williams KA Sr, Flack JM. 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: 2631-39.
- [16] Ference BA, Majeed F, Penumetcha R, Flack JM, Brook RD. 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: 1552-61.
- [17] Ference BA, Robinson J, Brook RD, Catapano AL, Chapman J, Neff DR, Voros S, Guigliano RP, Davey Smith G, Fazio S, Sabatine MS. Variation in PCSK9 and HMGCR and risk of cardiovascular disease and diabetes. *N Engl J Med* 2016; 375: 2144-53.
- [18] Little J, Khoury MJ. Mendelian randomization: A new spin or real progress? *Lancet* 2003; 362: 930-1.
- [19] Weis K, Terwilliger J. How many diseases does it take to map a gene with SNPs? *Nature Genetics* 2000; 2626: 151-57.
- [20] Palmer TM, Lawlor DA, Harbord RM, Sheehan NA, Tobias JH, Timpson NJ, Davey Smith G, Sterne JA. Using multiple genetic variants as instrumental variables for modifiable risk factors. *Stat Methods Med Res* 2012; 21: 223-42.
- [21] Nitsch D, Molokhia M, Smeeth L, DeStavola BL, Whittaker JC, Leon DA. Limits to causal inference based on Mendelian randomization: a comparison with randomized controlled trials. *Am J Epidemiol.* 2006; 163: 397-403.
- [22] Bennett DA. An Introduction to Instrumental Variables - Part 2: Mendelian Randomisation. *Neuroepidemiology* 2010; 35: 307-10.