

RESEARCH

Implicación del gen de la subunidad beta-3 de la proteína G en la diabetes materna

Víctor Guirado Osorio*, Susana R. Fernández Giacomassi, Pablo Bermúdez Gámez and Juan C. Vergara Ruz

*Correspondence: victorgo@uma.es
ETSI Informática, Universidad de
Málaga, Málaga, España
Full list of author information is
available at the end of the article

Abstract

Durante el embarazo, diversos mecanismos fisiológicos se ven afectados, incluyendo la regulación de leptina, adiponectina y la gluconeogénesis, lo que puede desencadenar complicaciones relacionadas con la diabetes materna (DM). Un mecanismo biológico de particular interés es la posible relación entre la DM y el gen GNB3, que está implicado en la ganancia de peso y la obesidad, factores que son conocidos por incrementar la resistencia a la insulina. Esto sugiere la necesidad de una mayor investigación para comprender mejor la contribución del gen GNB3, profundizando en su papel en la regulación de la glucosa y su influencia en el desarrollo de la DM.

Keywords: diabetes materna; insulina; GNB3

1 Introducción

La diabetes materna (DM) o diabetes gestacional (HP:0009800), es un trastorno que afecta a la secreción y la función de la insulina, conduciendo a la hiperglucemia [1]. Se caracteriza por su aparición en mujeres previamente normoglucémicas [1], tratándose de cualquier grado de intolerancia a la glucosa que se desarrolle por primera vez durante el embarazo [2], y que no sea claramente diabetes manifiesta [3]. Durante el embarazo se ve un aumento de hormonas locales y placentarias que conlleva a un estado de resistencia a la insulina, elevando los niveles de glucosa en sangre para soportar las demandas del feto [4]. Después de un embarazo saludable, la sensibilidad a la insulina vuelve a los niveles previos, mientras que en algunos casos no ocurre así, resultando en DM [4].

Se estima que el gasto en salud en personas diabéticas a nivel mundial en 2017 fue de 850 mil millones de dólares [5] y que las mujeres que padecen diabetes durante la gestación tienen diez veces más riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) que mujeres con un embarazo normal [6] [7]. La prevalencia de hiperglucemia en el embarazo entre mujeres de 20 a 49 años es de un 16% y la cifra va en aumento [8].

Se asocia a la DM con enfermedades cardíacas en el feto [9] e incluso con enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares en la madre [10]. También se ha relacionado con afecciones que actúan como factores de riesgo, como la obesidad [11] y la DMT2 [12]. En ambas, el incremento de citoquinas proinflamatorias es la principal causa de riesgo [13]. Otras patologías metabólicas, como el hipotiroidismo [14] o la hipotiroxinemia materna [15], también se han asociado negativamente con

la aparición de DM. Además de diversas complicaciones del recién nacido tras el embarazo [9][16], se ha observado cierta predisposición del bebé a desarrollar algún tipo de diabetes neonatal [17]. Esta predisposición, así como la de la madre, aparecen relacionadas con factores genéticos, como los polimorfismos de los genes KCNJ11, KCNQ1 [18] y ABCC8 [19] principalmente, también relacionados con la DMT2 [20].

Por otra parte, se ha visto una potencial relación con el gen GNB3, el cual codifica la subunidad beta-3 de la proteína G [21]. Esta proteína desempeña un papel clave en la transducción de señales intracelulares, afectando la respuesta celular a diversos estímulos, como la regulación de la glucosa [22]. Las alteraciones de esta subunidad se han visto implicadas en diversos mecanismos relacionados con la obesidad [23], hipertensión y diabetes [24].

El gen GNB3, que regula los niveles de glucosa mediante señalización, y se ha asociado directamente a la DMT2 [25], podría estar altamente implicado en la DM. Se han estudiado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que incrementan el riesgo de desarrollar DM [26]. Entre ellos, se ha descrito que los genotipos CT y TT del gen GNB3 podrían estar altamente relacionados con un riesgo alto de DM, y las mujeres con el alelo T tienen una ganancia de peso mayor durante la gestación [26].

Según lo expuesto pasamos a presentar la siguiente hipótesis en la siguiente sección.

1.1 Hipótesis

H1. Existe una asociación estadísticamente significativa entre la DM y el gen GNB3.

2 Materiales y métodos

2.1 Materiales

Los genes relacionados con el fenotipo “Maternal diabetes” (HP:0009800) fueron extraídos de la base de datos Human Phenotype Ontology (HPO) en la web hpo.jax [27]. Específicamente, se trabajó con una lista de 43 genes asociados al fenotipo, la cual se encontraba en formato .xlsx.

Se utilizaron las librerías de Python openpyxl 3.1.2, Stringdb 0.1.5 [28], Pandas 2.1.2 [29], iGraph 0.11.2 [30] y Cairoffi 1.6.1, para el procesamiento de datos y las representaciones.

Ejecutado en un MacBook Air 15 con Intel Core i5-5250U CPU 1.60GHz, 8 GB RAM y sistema operativo Ubuntu 22.04.3 LTS (Jammy Jellyfish).

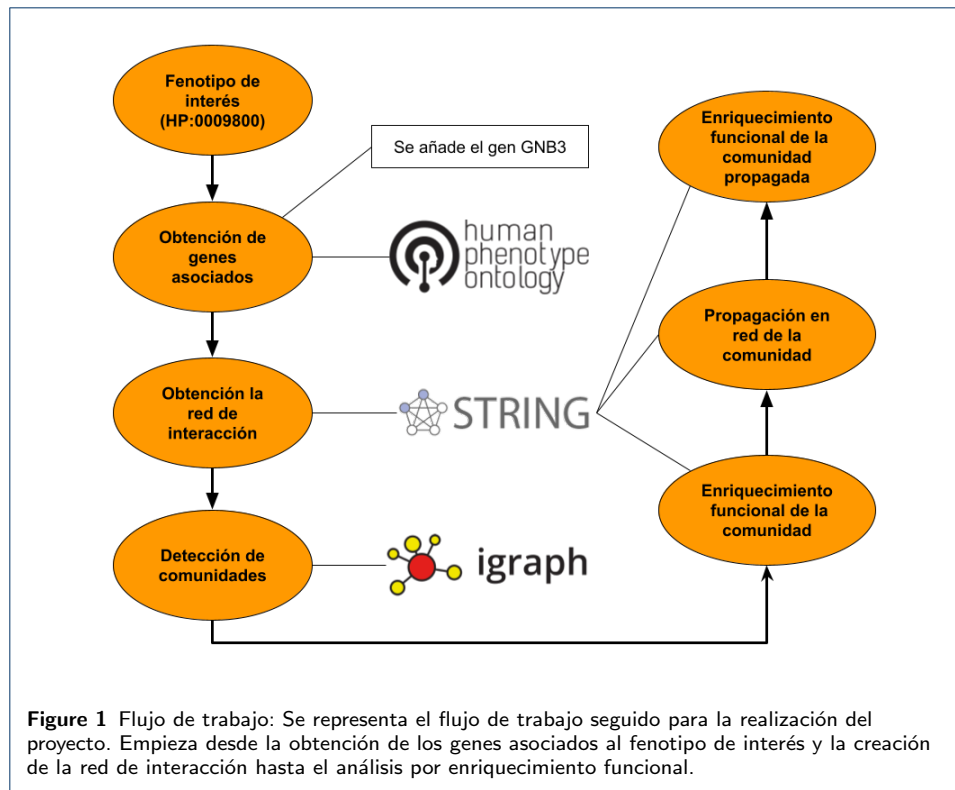
2.2 Metodología

El flujo de trabajo que se siguió puede observarse en la figura 1 y se explicará en detalle a continuación.

Descargamos la lista de genes implicados al fenotipo HP:0009800 directamente desde HPO en formato xlsx e insertamos en la lista el gen GNB3 (id = 2784).

Utilizamos la librería stringdb de Python para obtener la red de interacción de los genes asociados al fenotipo, su cantidad de nodos y enlaces. También fue obtenida la red de interacción de los genes asociados junto con el gen GNB3.

Mediante la librería de igraph se construyó la red de interacción de genes y se realizó un algoritmo de detección de comunidades basado en “edge betweenness” [31],



también conocido como intermediación de aristas. Esta métrica evalúa la influencia de un nodo sobre el flujo de información entre otros nodos [31]. Para encontrar qué aristas de una red están más entre otros pares de vértices, se define la intersección de una arista como el número de trayectorias más cortas entre los pares de vértices que corren a lo largo de ella. En cada paso del algoritmo se elimina la arista con menos intermediación [31]. Una vez realizada la detección, se seleccionó la comunidad donde estaba presente el gen GNB3.

Realizamos un enriquecimiento funcional de los genes que formaban parte de esa comunidad con la librería de stringdb y filtramos el resultado para quedarnos con las filas donde aparece el gen GNB3. El enriquecimiento funcional fue hecho con el método “get_enrichment” de la librería mencionada, que devuelve las vías enriquecidas, sus términos, categoría y valores como el p-valor y la tasa de descubrimiento falso (FDR). Entre las categorías, destacamos Reactome (RCTM), que es una base de datos de vías biológicas [32] y la categoría HPO [27] descrita en la sección de materiales.

Se creó una nueva red mediante una propagación en red de los genes presentes en la comunidad de interés, utilizando el método “get_network” del paquete stringdb con el parámetro “add_nodes = 16”, que añade nodos basándose en medidas de confianza. A partir de esta red volvimos a realizar un enriquecimiento funcional.

3 Resultados

3.1 Visión General

Hemos investigado el uso de la biología de sistemas para entender mejor el fenotipo diabetes materna. En esta sección presentaremos los resultados del análisis de la

red de genes relacionados con el fenotipo a partir de datos de interacción proteína-proteína descargados de STRINGdb con el propósito de estudiar la relación entre la diabetes materna y el gen GNB3.

A continuación procederemos a detallar los resultados obtenidos al ejecutar nuestro flujo de trabajo.

3.2 Red de interacción

Al descargar la lista de genes implicados en el fenotipo de estudio, observamos que la cantidad de enfermedades asociadas son 31 y los genes son 43. Hemos generado la red de interacción entre estos genes para obtener la cantidad de nodos e interacciones entre ellos. En la Tabla 1 se puede observar la cantidad de nodos (genes) y edges (interacciones) de la red sin incluir el gen GNB3 e incluyendo al gen para hacer la red.

Table 1 Cantidad de nodos e interacciones: Se ha creado la red de interacciones de los genes relacionados con el fenotipo y otra red añadiendo al gen de estudio. Finalmente, se ha obtenido la cantidad de nodos y edges de cada red.

Red	Nodos	Edges
Sin GNB3	43	272
Con GNB3	44	276

La red generada por stringdb usando los genes asociados a la diabetes materna y el GNB3 se puede observar en la Figura 2.

3.3 Detección de comunidades

Hemos detectado las comunidades de la red obtenida en el paso anterior, usando el método “edge betweenness” descrito en la sección de métodos. Obtuvimos cinco comunidades a partir de la red de interacciones. El GNB3 se encuentra presente en una comunidad con otros dos nodos, los genes SLC12A3 y el CLCNKB, como puede observarse en la Figura 3.

3.4 Enriquecimiento funcional

Una vez detectada la comunidad a la que pertenece el GNB3 en la red de estudio, hemos obtenido el enriquecimiento funcional para los tres genes pertenecientes a la comunidad. Filtrando aquellos resultados en los que aparece el gen GNB3, el análisis demostró un enriquecimiento para el fenotipo HPO de anormalidad de la visión, con un p-valor de 0.00021, como se puede observar en la Tabla 2

Table 2 Enriquecimiento funcional de la comunidad del gen GB3: Se observa el único resultado para el gen de interés.

Preferred Names	Description	P-value	fdr	Category	Term
GNB3, CLCNKB, SLC12A3	Abnormality of vision	0.00021	0.0197	HPO	HP:0000504

3.5 Propagación de la red

Hemos realizado la propagación de la red añadiendo 16 nodos más, que interactúan con los tres genes pertenecientes a la comunidad del gen GNB3. A continuación, hemos procedido a realizar el enriquecimiento funcional incluyendo los nuevos genes. En este caso, el gen de interés apareció implicado en 96 procesos, de los cuales se muestran aquellos relacionados con la regulación de insulina y glucagón en la

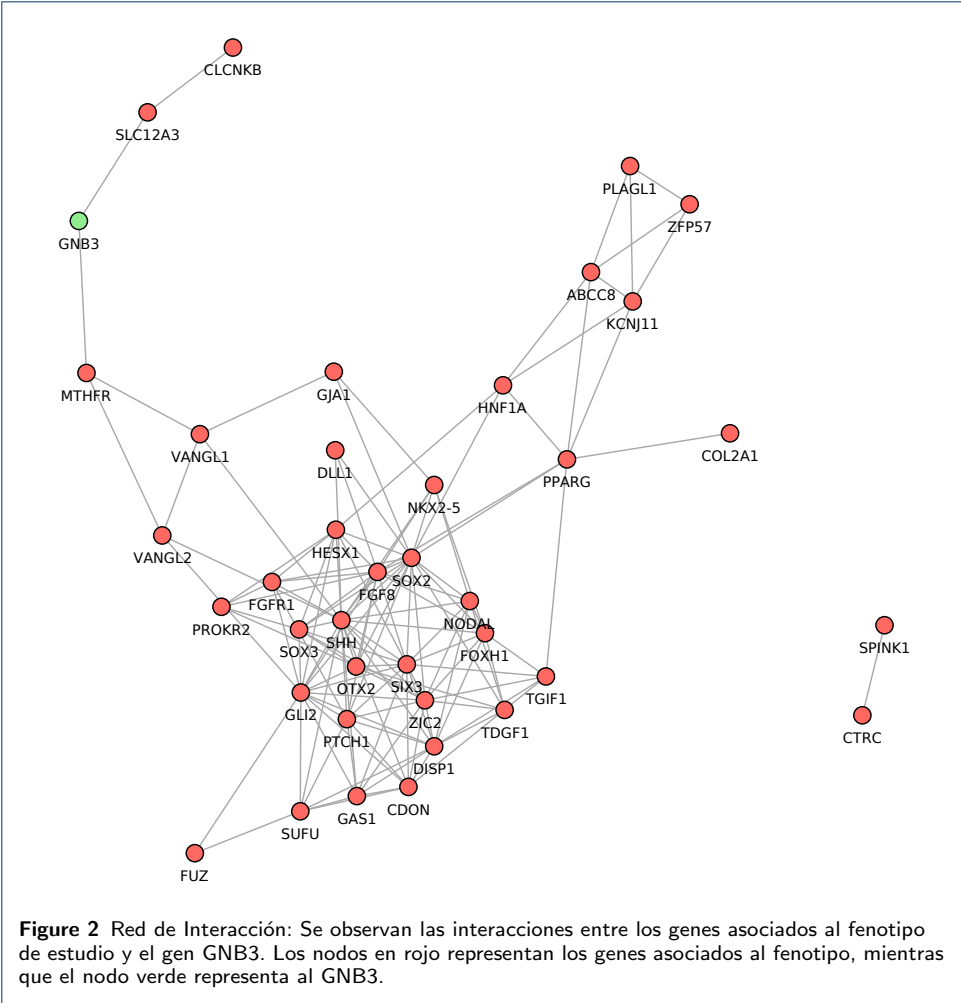


Tabla 3. Se puede observar que, en todos los casos representados, hay un enriquecimiento significativo en términos relacionados con RCTM, que ha sido introducido en la sección de métodos.

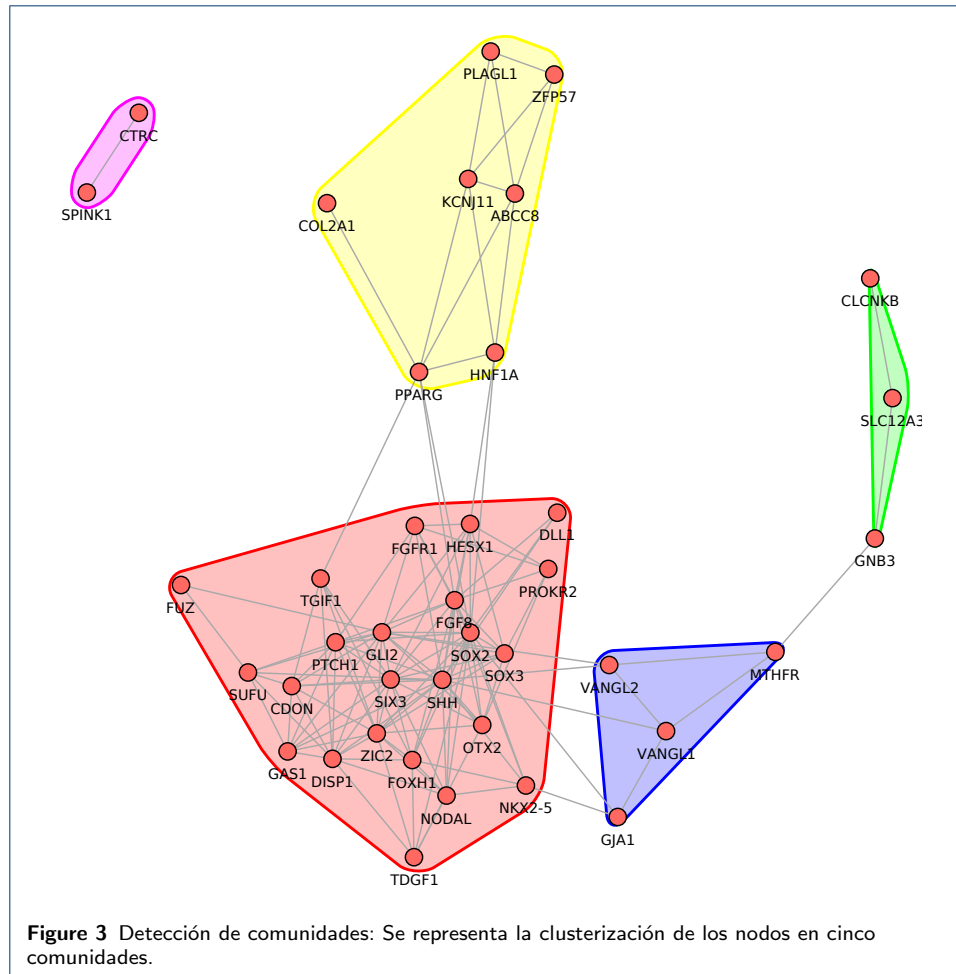
Table 3 Enriquecimiento funcional de la comunidad del gen GB3 expandida: Se observan los resultados que incluyen al gen GNB3 y que incluyen mecanismos relacionados con la insulina o el glucagón. Todos los resultados son de la categoría RCTM.

Description	P-value	fdr	Term
Regulation of insulin secretion	9.38e-30	1.05e-27	HSA-422356
Glucagon-like Peptide-1 (GLP1) regulates insulin secretion	3.57e-30	5.44e-28	HSA-381676
Adrenaline,noradrenaline inhibits insulin secretion	3.88e-29	3.28e-27	HSA-400042
Glucagon-type ligand receptors	2.51e-31	5.73e-29	HSA-420092
Glucagon-like Peptide-1 (GLP1) regulates insulin secretion	3.57e-30	5.44e-28	HSA-381676
Glucagon signaling in metabolic regulation	1.31e-25	6.95e-24	HSA-163359
Synthesis, secretion, and inactivation of Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1)	1.33e-06	4.39e-05	HSA-381771

Después de haber presentado los resultados, la discusión de los mismos seguirá en la próxima sección.

4 Discusión

Hemos encontrado que los genes implicados en el fenotipo de diabetes materna interactuaban con el gen GNB3 en mecanismos de regulación de insulina y glucagón.



Lo cual está relacionado con problemas de obesidad que pueden afectar a pacientes con este fenotipo. Además, encontramos que un subconjunto de genes del fenotipo estaban implicados en una anomalía en la visión.

La sospecha previa sobre la relación entre el gen GNB3 y la diabetes materna se confirma, respaldada por su participación común en los procesos de regulación de insulina[1, 21], los cuales han sido previamente asociados con problemas como la obesidad[11]. La conexión entre la diabetes materna y alteraciones en la visión, respaldada por estudios previos [33], se refleja en nuestros resultados.

La fuerza estadística de nuestros hallazgos se evidencia en los resultados del enriquecimiento funcional, donde todos los procesos obtenidos presentan p valores y FDR significativos. La simplificación de la red, limitándola a relaciones entre nodos únicos, mejora la eficiencia en la identificación de comunidades, focalizando nuestro interés en la existencia de relaciones más que en la cantidad de evidencias justificativas

Una limitación que presenta el estudio es que como no se obtuvieron procesos relacionados con la insulina en el primer enriquecimiento funcional, se realizó una propagación de la comunidad. Esto es un procedimiento correcto, ya que busca más nodos relacionados con la comunidad de estudio para encontrar más información. Sin

embargo, este paso fue en parte premeditado; es decir, la ejecución de la propagación solo se consideró tras obtener y analizar los resultados iniciales.

En vista de nuestros resultados, se abren diversas oportunidades para estudios confirmatorios que consoliden y expandan nuestras observaciones. En primer lugar, recomendamos la validación experimental de las interacciones identificadas entre los genes asociados a la diabetes materna y el gen GNB3 en los mecanismos de regulación de insulina y glucagón. La confirmación de estas interacciones mediante análisis de expresión diferencial[34] podría proporcionar una base sólida para futuros estudios clínicos.

Además, es importante abordar las preguntas que aún persisten en nuestra investigación. La propagación de la comunidad, aunque justificada, plantea la interrogante sobre la extensión de la red y la identificación de nuevos nodos relacionados con la diabetes materna. Se requieren estudios adicionales para comprender completamente la complejidad de estas interacciones y su contribución a los fenotipos asociados.

La especulación y recomendación sobre las implicaciones humanas más amplias de nuestros hallazgos son cruciales para contextualizar la relevancia de la investigación. En términos más amplios, la identificación de mecanismos de regulación de insulina y glucagón relacionados con la diabetes materna y la obesidad[11] mediante el gen GNB3 sugiere posibles objetivos terapéuticos. Esto no solo podría beneficiar a las personas con diabetes materna, sino también a aquellos en riesgo de desarrollar obesidad relacionada con problemas metabólicos. Los resultados de nuestro estudio pueden orientar estrategias preventivas y terapéuticas, mejorando la calidad de vida de las personas afectadas.

5 Conclusiones

En conclusión, nuestros hallazgos respaldan la asociación entre los genes relacionados con la diabetes materna y el gen GNB3 mediante los procesos de regulación metabólica de la insulina y el glucagón. La fuerza estadística de nuestros resultados, respaldada por análisis de enriquecimiento funcional significativos, subraya la validez de nuestras observaciones. Esta investigación sienta las bases para futuras exploraciones tanto a nivel experimental como clínico.

Reiteramos la importancia de considerar los resultados en el contexto de posibles aplicaciones terapéuticas y destacamos la relevancia de la gestión de la diabetes materna para abordar problemas metabólicos durante el embarazo. En última instancia, nuestros hallazgos proporcionan conocimientos clave para la comprensión y manejo de las complejas interrelaciones genéticas subyacentes a la diabetes materna y sus implicaciones en la salud.

Abreviaciones

DM: diabetes materna DMT2: diabetes mellitus tipo 2 SNP: single nucleotide polymorphism RCTM: Reactome
FDR: tasa de descubrimiento falso

Disponibilidad de datos y materiales

Contribución de los autores

V.G.O : introducción; S.R.F.G : introducción; P.B.G : introducción; J.C.V.R : introducción

Author details

ETSI Informática, Universidad de Málaga, Málaga, España.

References

1. Rodolaki, K., Pergialiotis, V., Iakovidou, N., Boutsikou, T., Iliodromiti, Z., Kanaka-Gantenbein, C.: The impact of maternal diabetes on the future health and neurodevelopment of the offspring: a review of the evidence (2023). doi:10.3389/fendo.2023.1125628
2. Association, A.D.: Diagnosis and classification of diabetes mellitus (2009). doi:10.2337/dc09-S062
3. Dalfrà, M.G., Burlina, S., Vescovo, G.G.D., Lapolla, A.: Genetics and Epigenetics: New Insight on Gestational Diabetes Mellitus (2020). doi:10.3389/fendo.2020.602477
4. Plows, J.F., Stanley, J.L., Baker, P.N., Reynolds, C.M., Vickers, M.H.: The pathophysiology of gestational diabetes mellitus (2018). doi:10.3390/ijms19113342
5. Cho, N.H., Shaw, J.E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J.D., Ohlrogge, A.W., Malanda, B.: Idf diabetes atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice* **138**, 271–281 (2018). doi:10.1016/J.DIABRES.2018.02.023
6. Vounzoulaki, E., Khunti, K., Abner, S.C., Tan, B.K., Davies, M.J., Gillies, C.L.: Progression to type 2 diabetes in women with a known history of gestational diabetes: systematic review and meta-analysis (2020). doi:10.1136/bmj.m1361
7. You, H., Hu, J., Liu, Y., Luo, B., Lei, A.: Risk of type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes mellitus: A systematic review meta-analysis. *Indian Journal of Medical Research, Supplement* **154**, 62–77 (2021). doi:10.4103/ijmr.IJMR5218
8. Guariguata, L., Linnenkamp, U., Beagley, J., Whiting, D.R., Cho, N.H.: Global estimates of the prevalence of hyperglycaemia in pregnancy. *Diabetes research and clinical practice* **103**, 176–85 (2014). doi:10.1016/j.diabres.2013.11.003
9. Depla, A.L., Wit, L.D., Steenhuis, T.J., Sliker, M.G., Voormolen, D.N., Scheffer, P.G., Heus, R.D., Rijn, B.B.V., Bekker, M.N.: Effect of maternal diabetes on fetal heart function on echocardiography: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* **57**, 539–550 (2021). doi:10.1002/uog.22163
10. Xie, W., Wang, Y., Xiao, S., Qiu, L., Yu, Y., Zhang, Z.: Association of gestational diabetes mellitus with overall and type specific cardiovascular and cerebrovascular diseases: systematic review and meta-analysis (2022). doi:10.1136/bmj-2022-070244
11. Shah, A., Stotland, N.E., Cheng, Y.W., Ramos, G.A., Caughey, A.B.: The association between body mass index and gestational diabetes mellitus varies by race/ethnicity. *American Journal of Perinatology* **28** (2011). doi:10.1055/s-0031-1272968
12. Ben-Haroush, A., Yogev, Y., Hod, M.: Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes (2004). doi:10.1046/j.1464-5491.2003.00985.x
13. Pantham, P., Aye, I.L.M.H., Powell, T.L.: Inflammation in maternal obesity and gestational diabetes mellitus. *Placenta* **36** (2015). doi:10.1016/j.placenta.2015.04.006
14. Gong, L.L., Liu, H., Liu, L.H.: Relationship between hypothyroidism and the incidence of gestational diabetes: A meta-analysis. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* **55** (2016). doi:10.1016/j.tjog.2016.02.004
15. Ömercan Topaloglu, Uzun, M., Topaloglu, S.N., Sahin, I.: Isolated maternal hypothyroxinemia may be associated with insulin requirement in gestational diabetes mellitus. *Hormone and Metabolic Research* **55** (2022). doi:10.1055/a-2003-0211
16. Metzger, B.E., Persson, B., Lowe, L.P., Dyer, A.R., Cruickshank, J.K., Deerochanawong, C., Halliday, H.L., Hennis, A.J., Liley, H., Ng, P.C., Coustan, D.R., Hadden, D.R., Hod, M., Oats, J.J.N., Trimble, E.R.: Hyperglycemia and adverse pregnancy outcome study: Neonatal glycemia. *Pediatrics* **126** (2010). doi:10.1542/peds.2009-2257
17. Dabelea, D., Hanson, R.L., Lindsay, R.S., Pettitt, D.J., Imperatore, G., Gabir, M.M., Roumain, J., Bennett, P.H., Knowler, W.C.: Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: A study of discordant sibships. *Diabetes* **49** (2000). doi:10.2337/diabetes.49.12.2208
18. Ao, D., Wang, H.J., Wang, L.F., Song, J.Y., Yang, H.X., Wang, Y.: The rs2237892 polymorphism in *kcq1* influences gestational diabetes mellitus and glucose levels: A case-control study and meta-analysis. *PLoS ONE* **10** (2015). doi:10.1371/journal.pone.0128901
19. Piccini, B., Coviello, C., Drovandi, L., Rosangela, A., Monzali, F., Casalini, E., Giglio, S., Toni, S., Dani, C.: Transient neonatal diabetes mellitus in a very preterm infant due to *abcc8* mutation. *AJP Reports* **8** (2018). doi:10.1055/s-0038-1636427
20. Khan, V., Verma, A.K., Bhatt, D., Khan, S., Hasan, R., Goyal, Y., Ramachandran, S., Alsahli, M.A., Rahmani, A.H., Almatroudi, A., Shareef, M.Y., Meena, B., Dev, K.: Association of genetic variants of *kcq1* and *kcq1* genes with risk of type 2 diabetes mellitus (t2dm) in the indian population: A case-control study. *International Journal of Endocrinology* **2020** (2020). doi:10.1155/2020/5924756
21. Feng, Y., Jiang, C.D., Chang, A.M., Shi, Y., Gao, J., Zhu, L., Zhang, Z.: Interactions among insulin resistance, inflammation factors, obesity-related gene polymorphisms, environmental risk factors, and diet in the development of gestational diabetes mellitus (2019). doi:10.1080/14767058.2018.1446207
22. Neves, S.R., Ram, P.T., Iyengar, R.: G protein pathways (2002). doi:10.1126/science.1071550
23. Hsiao, T.J., Hwang, Y., Liu, C.H., Chang, H.M., Lin, E.: Association of the *c825t* polymorphism in the *gnb3* gene with obesity and metabolic phenotypes in a taiwanese population. *Genes and Nutrition* **8** (2013). doi:10.1007/s12263-012-0304-8
24. Siffert, W.: G protein polymorphisms in hypertension, atherosclerosis and diabetes (2005). doi:10.1146/annurev.med.56.082103.104625
25. Rizvi, S., Raza, S.T., Rahman, Q., Mahdi, F.: Role of *GNB3*, *NET*, *KCNJ11*, *TCF7L2* and *GRL* genes single nucleotide polymorphism in the risk prediction of type 2 diabetes mellitus (2016). doi:10.1007/s13205-016-0572-x
26. Ortega-Contreras, B., Armella, A., Appel, J., Mennickent, D., Araya, J., González, M., Castro, E., Obregón, A.M., Lamperti, L., Gutiérrez, J., Guzmán-Gutiérrez, E.: Pathophysiological Role of Genetic Factors Associated With Gestational Diabetes Mellitus (2022). doi:10.3389/fphys.2022.769924

27. Kohler, S., Vasilevsky, N.A., Engelstad, M., Foster, E., McMurry, J., Aymé, S., Baynam, G., Bello, S.M., Boerkoel, C.F., Boycott, K.M., Brudno, M., Buske, O.J., Chinnery, P.F., Cipriani, V., Connell, L.E., Dawkins, H.J.S., DeMare, L.E., Devereau, A.D., Vries, B.B.A.D., Firth, H.V., Freson, K., Greene, D., Hamosh, A., Helbig, I., Hum, C., Jähn, J.A., James, R., Krause, R., Laulederkind, S.J.F., Lochmüller, H., Lyon, G.J., Ogishima, S., Olry, A., Ouwehand, W.H., Pontikos, N., Rath, A., Schaefer, F., Scott, R.H., Segal, M., Sergouniotis, P.I., Sever, R., Smith, C.L., Straub, V., Thompson, R., Turner, C., Turro, E., Veltman, M.W.M., Vulliamy, T., Yu, J., Ziegenweidt, J.V., Zankl, A., Züchner, S., Zemojtel, T., Jacobsen, J.O.B., Groza, T., Smedley, D., Mungall, C.J., Haendel, M., Robinson, P.N.: The human phenotype ontology in 2017. *Nucleic Acids Research* **45** (2017). doi:10.1093/nar/gkw1039
28. von Mering, C., Jensen, L.J., Snel, B., Hooper, S.D., Krupp, M., Foglierini, M., Jouffre, N., Huynen, M.A., Bork, P.: String: Known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Research* **33** (2005). doi:10.1093/nar/gki005
29. McKinney, W., Team, P.D.: Pandas - powerful python data analysis toolkit. Pandas - Powerful Python Data Analysis Toolkit (2015)
30. Csardi, G., Nepusz, T.: The igraph software package for complex network research. *InterJournal Complex Systems* **Complex Sy** (2006)
31. Girvan, M., Newman, M.E.J.: Community structure in social and biological networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99** (2002). doi:10.1073/pnas.122653799
32. Gillespie, M., Jassal, B., Stephan, R., Milacic, M., Rothfels, K., Senff-Ribeiro, A., Griss, J., Sevilla, C., Matthews, L., Gong, C., Deng, C., Varusai, T., Ragueneau, E., Haider, Y., May, B., Shamovsky, V., Weiser, J., Brunson, T., Sanati, N., Beckman, L., Shao, X., Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Murillo, J., Viteri, G., Cook, J., Shorser, S., Bader, G., Demir, E., Sander, C., Haw, R., Wu, G., Stein, L., Hermjakob, H., D'Eustachio, P.: The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucleic Acids Research* (2021). doi:10.1093/nar/gkab1028
33. Nelson, M., Lessell, S., Sadun, A.A.: Optic nerve hypoplasia and maternal diabetes mellitus. *Archives of Neurology* **43** (1986). doi:10.1001/archneur.1986.00520010016013
34. Haynes, W.A., Higdson, R., Stanberry, L., Collins, D., Kolker, E.: Differential expression analysis for pathways. *PLoS Computational Biology* **9** (2013). doi:10.1371/journal.pcbi.1002967