




Disminución de la inmunoreactividad a la subunidad $\beta 2$ del receptor $GABA_A$ en un modelo de autismo en ratas

Decreased $GABA_A$ receptor $\beta 2$ subunit immunoreactivity in a rat model of autism

Ángel A. Puig-Lagunes¹ , Frida S. Villada², Consuelo Morgado-Valle² , Luis Beltran-Parraza² ,
Lizbeth D. Chi-Castañeda²  y María L. López-Meraz^{2*} 

¹Facultad de Medicina, Universidad Veracruzana, Minatitlán; ²Instituto de Investigación Cerebral, Universidad Veracruzana, Xalapa. Ver., México

Resumen

Antecedentes: El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del cerebro; la activación de los receptores GABA tipo A ($GABA_A$) media sus acciones inhibitorias rápidas. Los individuos con trastorno del espectro autista (TEA) presentan anomalías en la expresión de los receptores $GABA_A$ en diversas áreas cerebrales. Asimismo, modelos animales de TEA sugieren alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica y una desregulación en el equilibrio entre los sistemas inhibitorios y excitatorios. **Objetivo:** Investigar la inmunoreactividad a la subunidad $\beta 2$ del receptor $GABA_A$ (GARB2) en el hipocampo, la amígdala y el tálamo de ratas infantiles expuestas prenatalmente a ácido valproico (AVP) como modelo de TEA. **Método:** Las hembras gestantes se inyectaron con AVP (600mg/Kg, i.p. grupo AVP) durante el día embrionario 12; las ratas control se inyectaron con salina (grupo SS). A los 14 días posnatales, las ratas de ambos grupos se perfundieron con NaCl 0.9% y paraformaldehído 4%, y se obtuvieron secciones cerebrales coronales (40 μ m de grosor). Se realizó inmunohistoquímica para detectar a GARB2. **Resultados:** Se identificó una disminución de la inmunoreactividad a GARB2 en el núcleo amigdaloides lateral, así como en los núcleos talámicos ventral y lateral del grupo AVP en comparación con el grupo SS. No se detectaron diferencias en el hipocampo. **Conclusión:** Los hallazgos sugieren que la exposición prenatal al AVP reduce la inmunoreactividad de GARB2 en regiones cerebrales límbicas implicadas en comportamientos socioemocionales, similar a informes previos en individuos con TEA. Nuestros resultados apoyan la implicación del sistema GABAérgico en la patogénesis del TEA.

Palabras clave: Ácido gamma-aminobutírico. Receptor $GABA_A$. Autismo. Ácido valproico. Subunidad $\beta 2$ del receptor $GABA_A$ (GARB2).

Abstract

Background: Gamma-aminobutyric acid (GABA) is the primary inhibitory neurotransmitter in the brain, and activation of GABA type A ($GABA_A$) receptors mediates rapid inhibitory actions. Numerous studies have shown that individuals with autism spectrum disorder (ASD) exhibit abnormalities in the expression of $GABA_A$ receptors in several brain areas. In addition, animal models of ASD have suggested alterations in GABAergic neurotransmission and dysregulation of the balance between inhibitory and excitatory systems. **Objective:** We investigated the immunolabeling of $GABA_A$ receptor $\beta 2$ subunit (GARB2) in the hippocampus, the amygdala, and the thalamus of infant rats prenatally exposed to valproic acid (AVP) as a model of ASD.

*Correspondencia:

María L. López-Meraz
E-mail: leonorlopez@uv.mx

Fecha de recepción: 20-05-2024
Fecha de aceptación: 13-06-2024
DOI: 10.24875/ANC.M24000002

Disponible en línea: 04-11-2024
Arch Neurocién (Mex). 2024;29(3):67-73
www.archivosdeneurociencias.mx

2954-4122 / © 2024 Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Publicado por Permanyer. Este es un artículo *open access* bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Methods: Pregnant female rats were injected with AVP (600mg/Kg, i.p.) on embryonic day 12; control rats were injected with saline (SS group). On postnatal day 14, rats from both groups were anesthetized, transcardially perfused with 0.9% NaCl and 4% paraformaldehyde, and sequential coronal brain slices (40 μ m thickness) were obtained. Immunohistochemistry was performed to detect GARB2, and the relative optical density (OD) of immunoreactivity was analyzed. **Results:** Our data showed a statistically significant decrease in GARB2 immunoreactivity in the lateral amygdaloid nucleus and the ventral and lateral thalamic nuclei of AVP group when compared to the SS group. No statistically significant differences were found in the hippocampus. **Conclusion:** Our findings suggest that prenatal exposure to AVP reduces GARB2 immunoreactivity in limbic brain regions involved in social-emotional behavior, consistent with previous reports in individuals with ASD. These findings support for the involvement of the GABAergic system in the pathogenesis of ASD.

Keywords: Gamma-aminobutyric acid. GABA_A receptor β 2 subunit (GARB2). Autism. Valproic acid. Gamma-aminobutyric acid type A receptor.

Introducción

El trastorno del espectro autista (TEA) es un complejo trastorno del neurodesarrollo caracterizado por dificultades en la comunicación social (verbal y no verbal), interacción y comportamientos repetitivos¹. Según los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades en los Estados Unidos, el TEA afecta a 1 de cada 44 niños, con una mayor prevalencia en niños que en niñas (4,2 veces más prevalente entre niños)². Sin embargo, la etiología del TEA sigue sin estar del todo clara.

Los sujetos que padecen TEA suelen presentar anomalías en los sistemas de neurotransmisión de glutamato³⁻⁶ y ácido gamma-aminobutírico (GABA)⁷⁻¹¹. Los receptores a GABA tipo A (GABA_A) son canales iónicos activados por ligando que median la inhibición rápida en el cerebro¹². Este receptor está compuesto por cinco subunidades proteicas con diferentes isoformas: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ y π ^{13,14}. La disposición más común de los receptores GABA_A en el sistema nervioso central (20-50% de todas las sinapsis centrales) es la α 1 β 2 γ 2^{15,16}, con GABA uniéndose entre las subunidades α y β ¹⁷. Los estudios de autoradiografía del tejido cerebral de personas con TEA han revelado una menor densidad de los receptores GABA_A y de benzodiazepinas en el hipocampo y la corteza cingulada anterior¹⁸⁻²⁰. Además, se ha detectado una menor expresión de ARNm de las subunidades α 6, β 2 y γ 2 del receptor GABA_A en la corteza frontal superior y el cerebelo de individuos con TEA¹⁰. Curiosamente, el gen que codifica la subunidad β 2 del receptor GABA_A se ha asociado con un mayor riesgo de TEA²¹. Además, 3-4% de las personas con TEA tiene duplicaciones cromosómicas en la región proximal del 15q11-q13, la anomalía cromosómica más observada en estos pacientes²². Esta región cromosómica contiene los genes GABRB3, GABRA5 y

GABRG3, que codifican las subunidades β 3, α 5 y γ 3 del receptor GABA_A, respectivamente²³.

Los estudios preclínicos que emplean el modelo de TEA a partir de administración de AVP en ratas han demostrado interrupciones en el equilibrio excitador/inhibidor en la amígdala²⁴, el hipocampo^{25,26} y la corteza cerebral²⁷. Se ha identificado un deterioro en la inhibición mediada por GABA en el hipocampo de ratas en el modelo inducido por AVP²⁷ y niveles más bajos de ARNm de las subunidades α 1, α 2, α 3 y β 3 del receptor GABA_A en la corteza prefrontal medial de roedores adultos²⁸. En este sentido, la evidencia con la que disponemos avala la hipótesis de la disfunción GABAérgica en el TEA. El modelo de autismo por AVP ha sido ampliamente utilizado como un modelo ambiental de TEA en roedores; no obstante, el efecto de la exposición prenatal a AVP sobre la expresión del receptor GABA_A en el cerebro no ha sido completamente caracterizado. En particular, el hipocampo, la amígdala y el tálamo son áreas del cerebro implicadas en alteraciones conductuales o cambios patológicos observados tanto en individuos con TEA como en modelos animales²⁹. Por lo tanto, nuestro objetivo fue investigar la expresión de la subunidad β 2 del receptor GABA_A (GARB2) en estas áreas del cerebro en ratas infantiles expuestas a AVP *in utero*.

El presente estudio se realizó en estricta conformidad con las guías sobre el manejo y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud y bajo las directrices ARRIVE.

Métodos

Animales

Este estudio se ajustó a las directrices mexicanas sobre manejo y uso de animales de laboratorio

(NOM-062-ZOO-1999) y fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Investigaciones Cerebrales (CICUAL-CICE 2017-002-c). Se obtuvieron ratas Wistar de nuestra colonia local y se alojaron en nuestro bio-terio. A lo largo del estudio, las ratas se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas, con las luces encendidas a las 08:00 horas, bajo condiciones de temperatura y humedad ambiental, con acceso libre a agua y alimento (Rismart). Las ratas hembra adultas con ciclos de fertilidad regulados se aparearon durante la noche con un macho sexualmente experto. La presencia de espermatozoides en los frotis vaginales a la mañana siguiente indicó el primer día de embarazo. En el día embrionario 12.5, las hembras recibieron una inyección intraperitoneal de 600 mg/kg de AVP (valproato de sodio, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, disuelto en NaCl 0.9% para una concentración de 250 mg/ml) para el grupo AVP. Las ratas control fueron inyectadas con NaCl 0.9% en el mismo día embrionario (grupo SS). Las hembras fueron alojadas individualmente y se les permitió criar a sus camadas³⁰. Los experimentos para evaluar la inmunorreactividad de GARB2 se realizaron en las crías en el día postnatal 14 (P14). El grupo SS consistió en 9 ratas (3 machos y 6 hembras), mientras que el grupo AVP consistió en 10 ratas (8 machos y 2 hembras).

Inmunohistoquímica

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.) y se perfundieron transcárdialmente con NaCl 0.9%, seguido de paraformaldehído al 4% (preparado en un tampón fosfato 0.1 M [PB], pH = 7.4) a una velocidad de flujo de 12 ml/min. Los cerebros se dejaron *in situ* durante la noche a 4°C. Al día siguiente, se retiraron y se posijaron en el mismo fijador durante 2 horas adicionales. Posteriormente, los cerebros se crioprotegieron con sacarosa al 30% (preparada en PB 0.1 M) durante 72 horas a 4°C. Se obtuvieron secciones coronales del cerebro (40 μm de grosor) a nivel del hipocampo dorsal utilizando un criostato Leica.

Para la detección inmunohistoquímica, las secciones se enjuagaron en PB 0.1 M con tritón al 0.1% (PBT 0.1%). Las peroxidases endógenas se inactivaron con peróxido de hidrógeno al 30% durante 10 minutos. Para bloquear la unión inespecífica, las secciones fueron tratadas con suero de caballo al 5% en PBT 0.3% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario contra GARB2 (1:1000; MAB341, Millipore) durante 48 horas

a 4°C. Luego, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado (1:400; Vector Laboratories Inc.) durante 90 minutos a temperatura ambiente, seguido de una incubación con el complejo avidina-biotina (kit ABC PK-6100 Vector Laboratories Elite-Standard Inc.) durante otros 90 minutos a temperatura ambiente. La inmunodetección se visualizó utilizando diaminobenzidina en presencia de níquel (SK-4100 Vector Laboratories Inc.). Las secciones cerebrales se montaron en portaobjetos de vidrio cargados electrostáticamente (Superfrost, Fisher Scientific) y se cubrieron con un medio no acuoso (Permount, Fisher). Algunas secciones cerebrales se procesaron sin emplear el anticuerpo primario para descartar la presencia de un marcaje inespecífico (control negativo); no se encontró inmunorreactividad no deseada.

Análisis densitométrico

Se tomaron fotomicrografías de tres secciones cerebrales distintas por rata (de uno de los hemisferios) utilizando un microscopio de luz Leica DM500 conectado a una cámara digital Leica ICC50 HD. Se utilizó el *software* Leica Application System LAS EZ 4.8 para este propósito. Se tomaron fotomicrografías del hipocampo dorsal (incluidos los estratos oriens, piramidal y radiatum en los campos CA1, CA2 y CA3, así como la capa de células granulares y el hilio del giro dentado), los núcleos lateral y basolateral de la amígdala y los núcleos ventral y lateral del tálamo. Se utilizó un brillo estándar del 55% y un aumento de $\times 40$.

La densidad óptica (DO) relativa de la inmunorreactividad de GARB2 se analizó utilizando el *software* Fiji Image J. El *software* se calibró según las instrucciones del desarrollador, lo que permitió la transformación de los valores de píxeles a una escala que correlaciona con la DO. Esto, a su vez, permitió determinar el valor medio de gris de la región de interés (ROI)³¹. La ROI se definió como 6,500 μm^2 para cada estrato del hipocampo y 70,000 μm^2 tanto para la amígdala como para el tálamo. La presencia de inmunorreactividad a GARB2 se observó de color gris a negro, mientras que su ausencia se observó con color blanco. El fondo de la DO se determinó promediando la DO del cuerpo calloso de las secciones utilizadas. Esta región cerebral se eligió porque no contiene receptores GABA_A³². Luego, se restó el fondo de todas las imágenes. La DO final de GARB2 para cada animal se obtuvo promediando la DO de las 3 secciones analizadas y se expresó en unidades arbitrarias. Una mayor DO

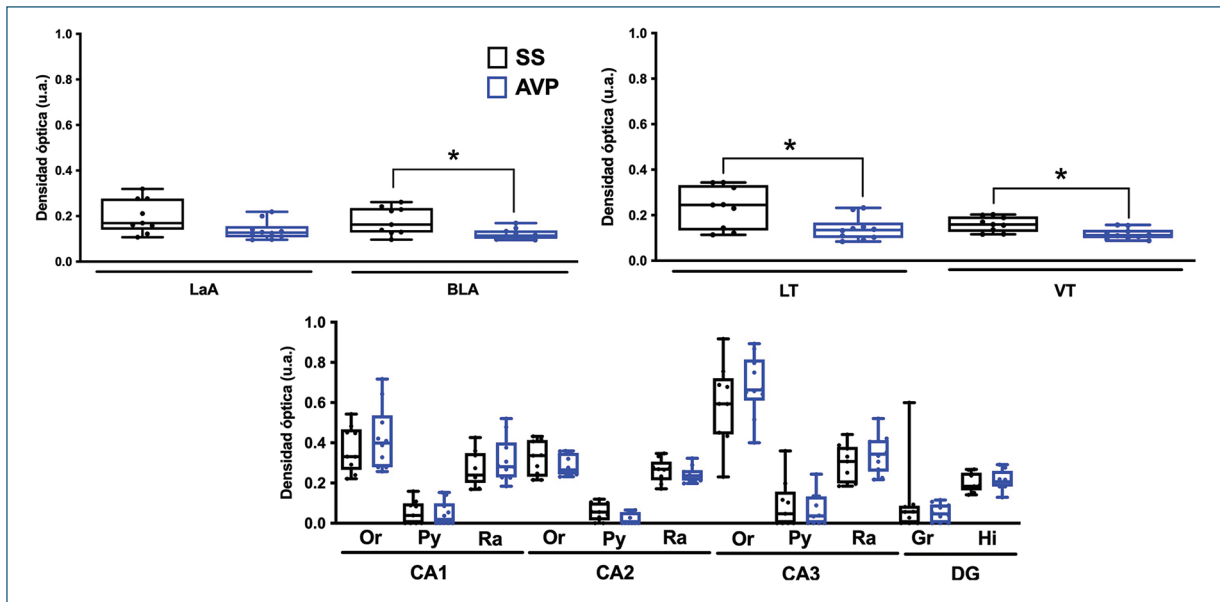


Figura 1. Efecto de la exposición prenatal al ácido valproico (AVP) en la inmunorreactividad del receptor de ácido gamma-aminobutírico β_2 en la amígdala, el tálamo y el hipocampo de crías de rata en el día postnatal 14. SS: solución salina; LaA: núcleo lateral de la amígdala; BLA: núcleo basolateral de la amígdala; LT: núcleo lateral del tálamo; VT: núcleo ventral del tálamo; Or: oriens; Py: piramidal; Ra: radiatum; GD: giro dentado; Gr: capa granular, Hi: hilio; regiones hipocámpicas CA1, CA2 y CA3 * $p < 0.05$.

relativa indica una mayor expresión de la proteína de interés.

Análisis estadístico

Los datos inicialmente seguían una distribución normal utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias en la inmunorreactividad de GARB2 entre los grupos AVP y SS en distintas regiones cerebrales se analizaron utilizando ya sea una prueba t de Student de dos colas para muestras independientes o una prueba de Mann-Whitney, según correspondiera. Los análisis se realizaron utilizando el *software* GraphPad Prism (versión 6), con un nivel de significación de $\alpha = 0,05$ ³¹.

Resultados

El análisis estadístico mostró que la administración prenatal de AVP redujo significativamente la inmunorreactividad de GARB2 en el núcleo basolateral de la amígdala ($t = 2.814$, $gl = 17$; $p = 0.012$) comparado con el grupo SS. También se observó un descenso no significativo en el núcleo lateral de la amígdala ($MWU = 21$; $p = 0.0534$). Asimismo, las ratas tratadas con AVP mostraron valores de DO bajos, lo que refleja un descenso de la inmunorreactividad de GARB2 tanto

en los núcleos lateral ($t = 2.804$, $gl = 17$; $p = 0.0122$) como ventral ($t = 3.281$, $gl = 17$; $p < 0.004$) del tálamo frente al grupo SS. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos AVP y SS en ninguna de las subregiones o estratos del hipocampo ($p > 0.05$), aunque sí una tendencia hacia una menor inmunorreactividad de GARB2 en la capa piramidal de CA2 ($MWU = 23.5$; $p = 0.07$; Figuras 1 y 2).

Discusión

Una hipótesis propuesta para explicar la etiología del TEA, es el desequilibrio entre la excitación y la inhibición neuronal, mediados principalmente por el glutamato y el GABA, respectivamente³³. En este estudio, encontramos que las ratas infantiles expuestas prenatalmente a AVP mostraron una menor inmunorreactividad de GARB2 en regiones específicas de la amígdala y el tálamo en comparación con las ratas de control. Estos resultados preclínicos respaldan la relevancia de los receptores de GABA en la fisiopatología del autismo.

Varios estudios han mostrado una disminución de los niveles de GABA en el lóbulo frontal y la corteza anterior de pacientes con TEA^{11,34} y una reducción de los niveles de glutamato descarboxilasa 65 y 67, la enzima que cataliza la conversión de glutamato a GABA, en la

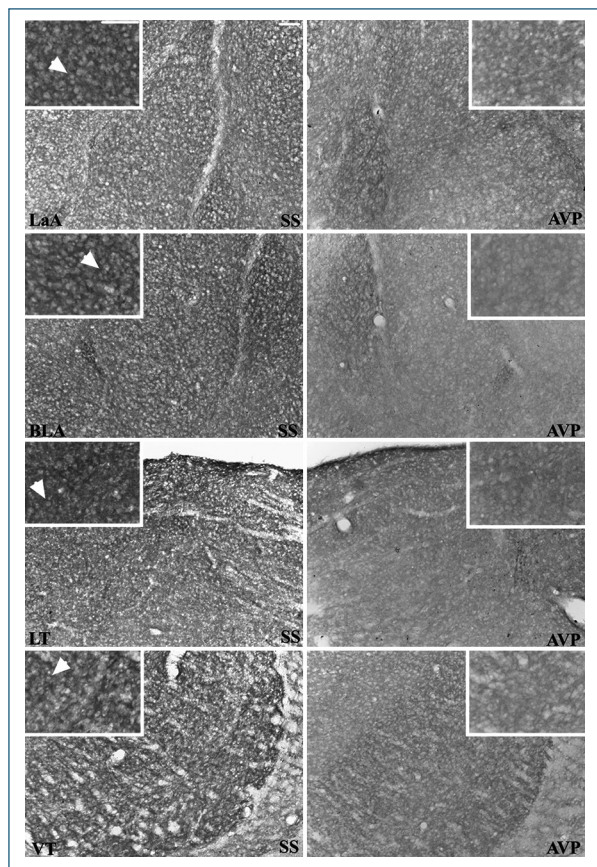


Figura 2. Las fotomicrografías muestran la inmunorreactividad del receptor de ácido gamma-aminobutírico $\beta 2$ (GARB2) en la amígdala y el tálamo de una cría de rata en el día postnatal 14 expuesta *in utero* al ácido valproico (AVP) o a una solución salina (SS). Los recuadros muestran una mayor inmunorreactividad de GARB2 en la rata del grupo SS que en la rata del grupo AVP (barras de escala = 100 μ m). Las cabezas de flecha señalan las células inmunorreactivas a GARB2. LaA: núcleo lateral de la amígdala; BLA: núcleo basolateral de la amígdala; LT: núcleo lateral del tálamo; VT: núcleo ventral del tálamo.

corteza parietal y el cerebelo de muestras *post-mortem* de adultos con TEA^{8,35}, y en el hipocampo y cerebelo de ratas expuestas a AVP³⁶. Con respecto a los receptores de GABA, se ha encontrado una menor densidad de receptores GABA_A en el hipocampo, la corteza cingulada anterior y posterior, y el giro fusiforme de tejido cerebral *post-mortem* de individuos con autismo¹⁸⁻²⁰. También se ha observado una disminución de los niveles proteicos de GARB2 en la corteza frontal superior y una regulación negativa de su ARNm en el cerebelo¹⁰. Curiosamente, también se han asociado polimorfismos de GARB2 con el TEA²¹. Un estudio de tomografía computarizada por emisión de fotón único

(SPECT) con (123) I-íomazenil (IMZ, un ligando del receptor a benzodiazepinas) en niños con TEA encontró un menor acúmulo de (123) I-IMZ en la corteza frontal media y superior³⁷. No obstante, un estudio más reciente no encontró cambios en la disponibilidad de receptores GABA_A o de la subunidad $\alpha 5$ en el receptor GABA_A en el hipocampo o la amígdala de adultos con TEA³³.

Nuestros resultados mostraron que las ratas infantiles expuestas prenatalmente a AVP tuvieron una menor inmunorreactividad de GARB2 en la amígdala y el tálamo en comparación con ratas de la misma edad con gestación estándar, hallazgos que coinciden con la hipótesis del desequilibrio entre la excitación y la inhibición en individuos con TEA. La menor expresión de GARB2, que indica indirectamente una menor disponibilidad de receptores GABA_A, podría contribuir a los déficits sociales^{25,38,39} y otros cambios neurológicos observados en el modelo de ratas AVP, como una mayor susceptibilidad a las convulsiones^{25,30}.

El gen que codifica GARB2 ha sido previamente asociado con un mayor riesgo de TEA²¹. Cabe destacar que tanto la amígdala como el tálamo han sido implicados en alteraciones conductuales y cambios patológicos observados en individuos con TEA y modelos animales^{25,29}.

En concordancia con nuestros hallazgos, Yang et al.²⁸ también describieron una transmisión inhibitoria GABAérgica deteriorada debido a una disminución de la liberación de GABA y de los niveles de ARNm de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\beta 3$ del receptor GABA_A en la corteza prefrontal medial de ratones expuestos a AVP. Estos autores también demostraron que la administración aguda de agonistas combinados de los receptores GABA_A y GABA_B redujo los déficits en sociabilidad, ansiedad y los comportamientos repetitivos en este modelo de TEA²⁸. Sin embargo, Bertelsen et al.⁴⁰ informaron un aumento en la unión de [11C] Ro15-4513 (un agonista con una alta afinidad por la subunidad α del receptor GABA_A) en la amígdala izquierda de ratas tratadas con AVP como modelo de TEA, aunque no se hallaron diferencias significativas en el tálamo frente a las ratas control. Ese estudio difiere del nuestro en el protocolo de administración de AVP y la metodología de detección del receptor. Los autores administraron 20 mg/kg de AVP diariamente durante el embarazo, mientras que nosotros inyectamos una dosis única de 600 mg/kg en el día embrionario 12. En este sentido, es esencial considerar las posibles diferencias en los cambios neurobiológicos evaluados dependiendo de los procedimientos

metodológicos utilizados. Un estudio realizado utilizando otros modelos de TEA en ratones (ratones *knockout* de *Cntnap2* o *Shank3* y ratones con la delección 16p11.2) no halló diferencias en los niveles de receptores GABA_A o su subunidad $\alpha 5$ en la corteza frontal, la corteza cingulada, el caudado/putamen, el hipocampo dorsal, el cerebelo o la amígdala entre estos tres modelos o en comparación con los ratones control³⁵. Esta discrepancia podría deberse a cambios específicos en las subunidades del receptor GABA_A o a la diferente etiología de los modelos de TEA (es decir, ambiental frente a genética). Se necesitan protocolos experimentales adicionales para comprender mejor la compleja neurobiología del TEA.

Conclusiones

Nuestro estudio proporciona nueva evidencia que respalda el papel que juega la disfunción GABAérgica, específicamente la expresión de GARB2, en la fisiopatología del TEA utilizando el modelo de AVP en ratas. Nuestros hallazgos indican que la exposición prenatal a AVP reduce la inmunorreactividad de GARB2 en la amígdala y el tálamo, regiones asociadas a déficits sociales y otras alteraciones neurológicas en el TEA. Estos hallazgos coinciden con la hipótesis de un desequilibrio entre la excitación e inhibición en individuos con TEA. No obstante, la compleja neurobiología del TEA requiere más investigación para esclarecer las contribuciones de las subunidades específicas del receptor GABA_A y las diversas etiologías de los modelos de TEA.

Una comprensión más profunda del papel del sistema GABAérgico en el TEA, incluido el impacto de los receptores gabaérgicos en el hipocampo, podría aportar en la búsqueda de nuevas intervenciones terapéuticas y ayudar a mejorar la calidad de vida de las personas con TEA.

Contribuciones de los autores

MLLM contribuyó a la conceptualización y el diseño del estudio, la preparación de materiales y proporcionó los recursos para el estudio. El primer borrador del manuscrito fue redactado por AAPL. FSV y AAPL realizaron los experimentos y contribuyeron a la adquisición y análisis de datos. LDCC, CMV y LBP proporcionaron recursos para el estudio y contribuyeron a la redacción, revisión y edición del manuscrito. Todos los autores comentaron las versiones anteriores del manuscrito. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final.

Financiamiento

La presente investigación no recibió donativos de agencias de los sectores público, comercial o con ánimo de lucro.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conforman a las normas éticas del comité responsable de experimentación humana y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes. Además, los autores han reconocido y seguido las recomendaciones según las directrices SAGER según el tipo y naturaleza del estudio.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Uso de inteligencia artificial para generar textos. Los autores declaran que no han utilizado algún tipo de inteligencia artificial generativa en la redacción de este manuscrito ni para la creación de figuras, gráficos, tablas o sus correspondientes leyendas o leyendas.

Bibliografía

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5^a ed. Washington, DC: APA Press; 2013.
2. Maenner MJ, Shaw KA, Bakian AV, Bilder DA, Durkin MS, Esler A, et al. Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years-autism and developmental disabilities monitoring network, 11 Sites, United States, 2018. *MMWR Surveill Summ.* 2021;70:1-16.
3. Hassan TH, Abdelrahman HM, Abdel Fattah NR, El-Masry NM, Hashim HM, El-Gerby KM, et al. Blood and brain glutamate levels in children with autistic disorder. *Res Autism Spectr Disord.* 2013;7:541-8.
4. Page LA, Daly E, Schmitz N, Simmons A, Toal F, Deeley Q, et al. *In vivo* 1H-magnetic resonance spectroscopy study of amygdala-hippocampal and parietal regions in autism. *Am J Psychiatry.* 2006;163:2189-92.
5. Shinohe A, Hashimoto K, Nakamura K, Tsujii M, Iwata Y, Tsuchiya KJ, et al. Increased serum levels of glutamate in adult patients with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2006;30:1472-7.
6. Shimmura C, Suda S, Tsuchiya KJ, Hashimoto K, Ohno K, Matsuzaki H, et al. Alteration of plasma glutamate and glutamine levels in children with high-functioning autism. *PLoS One.* 2011;6:e25340.
7. Ansary EI, Ayadhi AI. GABAergic/glutamatergic imbalance relative to excessive neuroinflammation in autism spectrum disorders. *J Neuroinflammation.* 2014;11:1-189.
8. Fatemi SH, Halt A, Sary J, Kanodia R, Schulz SC, Realmuto G. Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are reduced in autistic parietal and cerebellar cortices of autistic subjects. *Biol Psychiatry.* 2002;52:805-10.
9. Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD, Thuras PD. GABA(A) receptor downregulation in brains of subjects with autism. *J Autism Dev Disord.* 2009;39:223-30.
10. Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD, Rustan OG, Rooney RJ, Thuras PD. Downregulation of GABA_A receptor protein subunits $\alpha 6$, $\beta 2$, δ , ϵ , $\gamma 2$, θ , and $\rho 2$ in superior frontal cortex of subjects with Autism. *J Autism Dev Disord.* 2014;44:1833-45.

11. Harada M, Taki MM, Nose Y, Kubo H, Mori K, Nishitani H, et al. Non-invasive evaluation of the GABAergic/glutamatergic system in autistic patients observed by MEGA-editing proton MR spectroscopy using a clinical 3 tesla instrument. *J Autism Dev Disord.* 2011;41:447-54.
12. Bormann J. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21:16-9.
13. Olsen RW, Sieghart W. International union of pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev.* 2008;60:243-60.
14. Olsen RW, Sieghart W. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology.* 2009;56:141-8.
15. Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience.* 2000;101:815-50.
16. Nutt D. GABA_A receptors: subtypes, regional distribution, and function. *J Clin Sleep Med.* 2006;2:S7-11.
17. Whiting PJ, Bonnett TP, McKernan RM, Farrar S, Le Bourdellès B, Heavens RP, et al. Molecular and functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;868:645-53.
18. Blatt GJ, Fitzgerald CM, Gupthill JT, Booker AB, Kemper TL, Bauman ML. Density and distribution of hippocampal neurotransmitter receptors in autism: an autoradiographic study. *J Autism Dev Disord.* 2001;31:537-43.
19. Oblak A, Gibbs TT, Blatt GJ. Decreased GABA_A receptors and benzodiazepine binding sites in the anterior cingulate cortex in autism. *Autism Res.* 2009;2:205-19.
20. Oblak AL, Gibbs T, Blatt GJ. Reduced GABA_A receptors and benzodiazepine binding sites in the posterior cingulate cortex and fusiform gyrus in autism. *Brain Res.* 2011;1380:218-28.
21. Ma DQ, Whitehead PL, Menold MM, Martin ER, Ashley-Koch AE, Mei H, et al. Identification of significant association and gene-gene interaction of GABA receptor subunit genes in autism. *Am J Hum Genet.* 2005;77:377-88.
22. Lamb J, Moore J, Bailey A, Monaco AP. Autism: recent molecular genetic advances. *Hum Mol Genet.* 2000;9:861-8.
23. Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev.* 2004;84:835-67.
24. Lin HC, Gean PW, Wang CC, Chan YH, Chen PS. The amygdala excitatory/inhibitory balance in a valproate-induced rat autism model. *PLoS One.* 2013;8:e55248.
25. Kim KC, Kim P, Go HS, Choi CS, Park JH, Kim HJ, et al. Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in pre-natal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. *J Neurochem.* 2013;124:832-43.
26. Bristot Silvestrin R, Bambini-Junior V, Galland F, Daniele Bobermim L, Quincozes-Santos A, Torres Abib R, et al. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: altered glutamate metabolism in the hippocampus. *Brain Res.* 2013;1495:52-60.
27. Banerjee A, García-Oscos F, Roychowdhury S, Galindo LC, Hall S, Kilgard MP, et al. Impairment of cortical GABAergic synaptic transmission in an environmental rat model of autism. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013;16:1309-18.
28. Yang JQ, Yang CH, Yin BQ. Combined the GABA-A and GABA-B receptor agonists attenuates autistic behaviors in a prenatal valproic acid-induced mouse model of autism. *Behav Brain Res.* 2021; 403:113094.
29. Amaral DG, Schumann CM, Nordahl CW. Neuroanatomy of autism. *Trends Neurosci.* 2008;31:137-45.
30. Puig-Lagunes AA, Manzo J, Beltrán-Parrazal L, Morgado-Valle C, Toledo-Cárdenas R, López-Meraz ML. Pentylentetrazole-induced seizures in developing rats prenatally exposed to valproic acid. *PeerJ.* 2016;4: e2709.
31. Rasband WS. ImageJ. Bethesda, Maryland, USA: U.S. National Institutes of Health; 1997-2018. Disponible en: <https://imagej.nih.gov/ij>
32. Richards JG, Schoch P, Haring P, Takacs B, Möhler H. Resolving GABA/benzodiazepine receptors: cellular and subcellular localization in the CNS with monoclonal antibodies. *J Neurosci.* 1987;7:1866-6.
33. Horder J, Petrinovic MM, Mendez MA, Bruns A, Takumi T, Spooren W, et al. Glutamate and GABA in autism spectrum disorder—a translational magnetic resonance spectroscopy study in man and rodent models. *Transl Psychiatry.* 2018;8:106.
34. Cochran DM, Sikoglu EM, Hodge SM, Edden RA, Foley A, Kennedy DN, et al. Relationship among glutamine, γ -aminobutyric acid, and social cognition in autism spectrum disorders. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 2015;25:314-22.
35. Horder J, Andersson M, Mendez MA, Singh N, Tangen Å, Lundberg J, et al. GABA_A receptor availability is not altered in adults with autism spectrum disorder or in mouse models. *Sci Transl Med.* 2018;10:eaam8434.
36. Hou Q, Wang Y, Li Y, Chen D, Yang F, Wang S. A developmental study of abnormal behaviors and altered GABAergic signaling in the VPA-treated rat model of autism. *Front Behav Neurosci.* 2018;12:182.
37. Mori T, Mori K, Fujii E, Toda Y, Miyazaki M, Harada M, et al. Evaluation of the GABAergic nervous system in autistic brain: (123I)-iomazenil SPECT study. *Brain Dev.* 2021;34:648-54.
38. Bambini-Junior V, Rodrigues L, Behr GA, Moreira JC, Riesgo R, Gottfried C. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. *Brain Res.* 2011;1408:8-16.
39. Schneider T, Przewlocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology.* 2005;30:80-9.
40. Bertelsen F, Møller A, Folloni D, Drasbek KR, Scheel-Krüger J, Landau AM. Increased GABA_A receptor binding in amygdala after prenatal administration of valproic acid to rats. *Acta Neuropsychiatr.* 2017;29:309-14.