

Imagens contrastadas por manganês na fase aguda da epilepsia induzida por pilocarpina

Manganese-enhanced magnetic resonance imaging in the acute phase of pilocarpine induced model of epilepsy

Jackeline Moraes Malheiros¹, Beatriz Monteiro Longo², Alberto Tannús³, Luciene Covolan²

RESUMO

As imagens de ressonância magnética são úteis no estudo de modelos experimentais de epilepsia do lobo temporal. A técnica *manganese-enhanced MRI* (MEMRI) é de interesse por combinar os efeitos provocados pelo manganês no aumento do contraste de populações celulares ativadas, ao competir com o cálcio na transmissão sináptica. Assim, o propósito deste estudo foi investigar a evolução temporal do contraste provocado pelo manganês na fase aguda da epilepsia do lobo temporal induzida por pilocarpina sistêmica e compará-las à expressão da proteína c-Fos. Nessa fase, a intensidade do sinal MEMRI foi analisada em três diferentes pontos temporais (5, 15 ou 30 minutos) após o início do *status epilepticus* (SE). O grupo que foi mantido em *status epilepticus* por 30 minutos mostrou diminuição na intensidade de sinal no CA1 e giro denteado (GD). Não houve diferenças entre o Grupo Controle e os outros grupos tratados com pilocarpina. A expressão da proteína c-Fos, nos mesmos animais, mostrou que, mesmo no *status epilepticus* de curta duração (5 minutos) já há ativação celular máxima nas sub-regiões do hipocampo (GD, CA1 e CA3). Nas condições experimentais testadas, nossos dados sugerem que o sinal MEMRI não foi sensível para identificar variações detectáveis da ativação celular na fase aguda do modelo de pilocarpina. Nossos achados não são consistentes com a ideia que o contraste por manganês reflete primariamente alterações na atividade celular durante o SE quando outros elementos modificadores do sinal podem atuar.

Descritores: Epilepsia/radiografia; Hipocampo; Imagem por ressonância magnética/métodos; Manganês/uso diagnóstico

ABSTRACT

Magnetic resonance images are useful in the study of experimental models of temporal lobe epilepsy. The manganese-enhanced MRI

(MEMRI) technique is of interest since it combines the effects caused by manganese on the increased contrast in activated cell populations, when competing with calcium in synaptic transmission. Thus, the purpose of this study was to investigate the temporal evolution of the contrast related to manganese in the acute phase of temporal lobe epilepsy induced by systemic pilocarpine and compare it to the expression of the c-Fos protein. During this phase, the intensity of the MEMRI signal was analyzed at three different time points (5, 15 or 30 minutes) after the onset of *status epilepticus* (SE). The group that was maintained in *status epilepticus* for 30 minutes showed a decrease in intensity of the signal in CA1 and the dentate gyrus (DG). There were no differences between the control group and the other groups treated with pilocarpine. The expression of the protein, c-Fos, in the same animals showed that even in the short-duration *status epilepticus* (5 minutes), there was already maximal cellular activation in subregions of the hippocampus (DG, CA1 and CA3). Under the experimental conditions tested, our data suggest that the MEMRI signal was not sensitive for the identification of detectable variations of cell activation in the acute phase of the pilocarpine model. Our findings are not consistent with the idea that manganese contrast reflects primarily alterations in cellular activity during SE when other signal-modifying elements can act.

Keywords: Epilepsy/radiography; Hippocampus; Magnetic resonance imaging/methods; Manganese/diagnostic use

INTRODUÇÃO

Modelos animais, como o da pilocarpina e do ácido caínico⁽¹⁻³⁾, são muito utilizados para o estudo da epilepsia do lobo temporal (ELT). Comparada a técnicas histológicas, as imagens por ressonância magnética (IRM) são uma forma muito útil para abordagem longitudinal

¹Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo (SP), Brasil; Centro de Imagens e Espectroscopia *in vivo* por Ressonância Magnética (CIERMAG), Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo – USP, São Carlos (SP), Brasil.

²Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo (SP), Brasil.

³Centro de Imagens e Espectroscopia *in vivo* por Ressonância Magnética (CIERMAG), Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo – USP, São Carlos (SP), Brasil.

Autor correspondente: Luciene Covolan – Universidade Federal de São Paulo – Rua Botucatu, 862, 5º andar – CEP: 04023-062 – São Paulo (SP), Brasil – Tel: (11) 5579-2033 – E-mail: lcovolan@unifesp.br

Data de submissão: 19/3/2012 – Data de aceite: 25/05/2012

em modelos animais. Apesar do crescente número de publicações científicas sobre aplicações de técnicas de IRM, inclusive sobre a utilização do realce por mangnês (MEMRI) em modelos animais de ELT^(1,2) diversos aspectos anatômicos da epileptogênese ainda aguardam definição, como, por exemplo, a sequência de ativação das áreas cerebrais causada pelas crises induzidas. Além de estudos morfológicos e anatômicos, a IRM fornece variedade de informações de acordo com a sequência utilizada, por exemplo, informações funcionais e de alterações metabólicas.

Em roedores, a presença de MnCl₂ proporciona excelente contraste da anatomia cerebral em IRM, sendo que regiões como o hipocampo, a glândula pituitária, o cerebelo e o bulbo olfatório são naturalmente realçados, a despeito de qualquer estímulo⁽⁴⁾. O MnCl₂ atua como meio para aumentar o contraste entre as diversas estruturas encefálicas, por diminuir tanto o tempo de relaxação T₁ como o T₂ da água adjacente⁽⁴⁾. Na fase final do potencial de ação, o íon Mn²⁺ compete com o íon Ca²⁺ na despolarização dos botões sinápticos. Dessa forma, ao ser interiorizado pelos neurônios que estão em alta atividade no foco da descarga epiléptica, o íon Mn²⁺ serve como um traçador de vias neurais ativadas.

Os estudos utilizando técnicas de IRM, na fase aguda do modelo do ácido caínico, resultaram em pouca ou nenhuma definição das áreas de maior atividade, possivelmente obscurecidas pela lesão celular que ocorre nessa fase, após o estado de mal epiléptico (*status epilepticus* – SE) de longa duração (90 minutos)⁽²⁾. Similarmente, como estudos realizados na fase crônica também não foram capazes de correlacionar a frequência de crises e a hiperintensidade MEMRI, os autores concluíram que a atividade celular decorrente da crise não seria capaz de causar hiperintensidade MEMRI⁽⁵⁾. Por outro lado, a hiperintensidade MEMRI foi demonstrada em diversos estudos, em áreas especificamente ativas do cérebro após vários estímulos, como os sonoros⁽⁶⁾.

Baseado nestes estudos, conclui-se que identificar as regiões do cérebro ativadas no insulto inicial ainda é um desafio importante a ser superado no estudo de modelos animais de ELT⁽⁷⁾, utilizando técnicas de IRM. Considerando que 5 minutos de atividade epiléptica contínua já é considerado suficiente para definir SE^(1,2), a proposta do presente estudo foi induzir e permitir que o SE tivesse duração curta, na tentativa de obter melhor definição de áreas hipocámpais de maior atividade, sem que houvesse interferência causada pela morte celular, presente no SE duradouro⁽⁸⁾. A expressão da proteína c-Fos é um indicador de atividade celular intensa, previamente utilizada na identificação de áreas ativadas, tanto nas crises epilépticas espontâneas recorrentes

quanto na reindução do SE⁽⁹⁾. Assim, o objetivo do presente estudo foi identificar a existência de paralelismo entre a expressão dessa proteína e a intensidade do sinal MEMRI em diferentes durações do SE. Os dados obtidos a partir da análise da intensidade MEMRI foram comparados à análise da expressão da proteína c-Fos nos mesmos animais.

MÉTODOS

Os animais utilizados no presente estudo foram provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da UNIFESP (CEP: 0750/07). Foram utilizados ratos Wistar adultos machos (230 a 280g) mantidos em grupos de cinco sob ciclo claro/escuro 12/12h.

A dose de MnCl₂ utilizada deve ser suficiente para fornecer o contraste desejado na IRM, mas deve ser a menor possível devido à sua toxicidade, além de ser calculada para o equipamento em uso. A dose usada no presente estudo foi baseada em testes preliminares realizados em nosso laboratório. Doses de 60 a 90mg/kg fornecem bom contraste entre as estruturas. Optou-se pelo uso da dose de 60mg/kg, uma vez que ela não alterou a taxa de mortalidade associada ao estado de mal epiléptico, em oposição à de 90mg/kg.

Inicialmente, os animais receberam uma solução de MnCl₂.4H₂O (Sigma, 60mg/kg, volume de 0,3mL/100g de animal)⁽¹⁰⁾, e, 12 horas depois, as crises foram induzidas por meio da injeção intraperitoneal (ip) de pilocarpina (Pilo, 300mg/kg, Merck, antecedida 30 minutos pela administração de metilscopolamina (1mg/kg, Sigma, ip) para reduzir os efeitos periféricos da pilocarpina. Os animais que apresentaram SE foram divididos em três grupos, de acordo com a permanência do SE: 5 minutos (Grupo SE-5; n=5), 15 minutos (Grupo SE-15; n=6) e 30 minutos (Grupo SE-30; n=8). Os animais que não apresentaram SE em até 2 horas após a pilocarpina, foram excluídos do estudo. O Grupo Controle (n=8) recebeu solução salina 0,9% ao invés de outras soluções.

A determinação da ocorrência do SE observada comportamentalmente teve como base a escala de Racine⁽⁷⁾. O início do SE foi definido após 5 minutos de atividade de crise contínua. Nos diferentes períodos de tempo determinados descritos anteriormente, todos os grupos experimentais, incluindo o Controle, receberam uma mistura de tionembutal+diazepam (30 + 10mg/kg; ip). Registros eletroencefalográficos prévios mostraram que a utilização dessa mistura cessa o SE em até 10 mi-

nutos⁽¹¹⁾. O mesmo foi verificado por meio de análise comportamental no corrente estudo.

Para diminuir a taxa de mortalidade pós-SE, os animais foram colocados em posição supina sobre a mesa cirúrgica, traqueostomizados, intubados (tubo de aproximadamente 0,5mm de diâmetro) e conectados a um respirador para pequenos animais (modelo 7025, Ugo Basile) e ventilados com ar ambiente (FiO₂ 21%) com frequência respiratória de 70 ciclos/min e volume de 3,5mL/ciclo.

As IRM foram adquiridas utilizando um magneto supercondutor horizontal com campo 2T (Oxford Instruments), que opera em conjunto com um espectrômetro Bruker®. A sequência FLASH (*Fast Low-Angle SHot*) foi utilizada na aquisição de imagens ponderadas por T₁ (TR=200ms, TE=5,8ms, ângulo de flip=90°, 4

médias, 40 minutos/animal). O FOV utilizado foi de 40x40x11,2mm³ com matriz de 192x192x16 pontos, produzindo resolução espacial de 208x208x700mm³.

Após aquisição das imagens, os animais foram perfundidos por via transcardíaca, com solução de salina tamponada 0,9% e, posteriormente, paraformaldeído 4% a 4°C. Os cérebros foram imediatamente removidos e imersos em solução sacarose 30% por 24 horas, a 4°C. Com auxílio de um criostato, os cérebros foram cortados em seções coronais com 30mm de espessura.

A imunorreatividade para c-Fos foi detectada utilizando a técnica imunistoquímica convencional da avidina-biotina-imunoperoxidase⁽¹²⁾.

Os sinais relativos a partir das IRM das regiões GD, CA1 e CA3 (Figura 1) foram quantificados em uma imagem no plano coronal, aproximadamente no nível

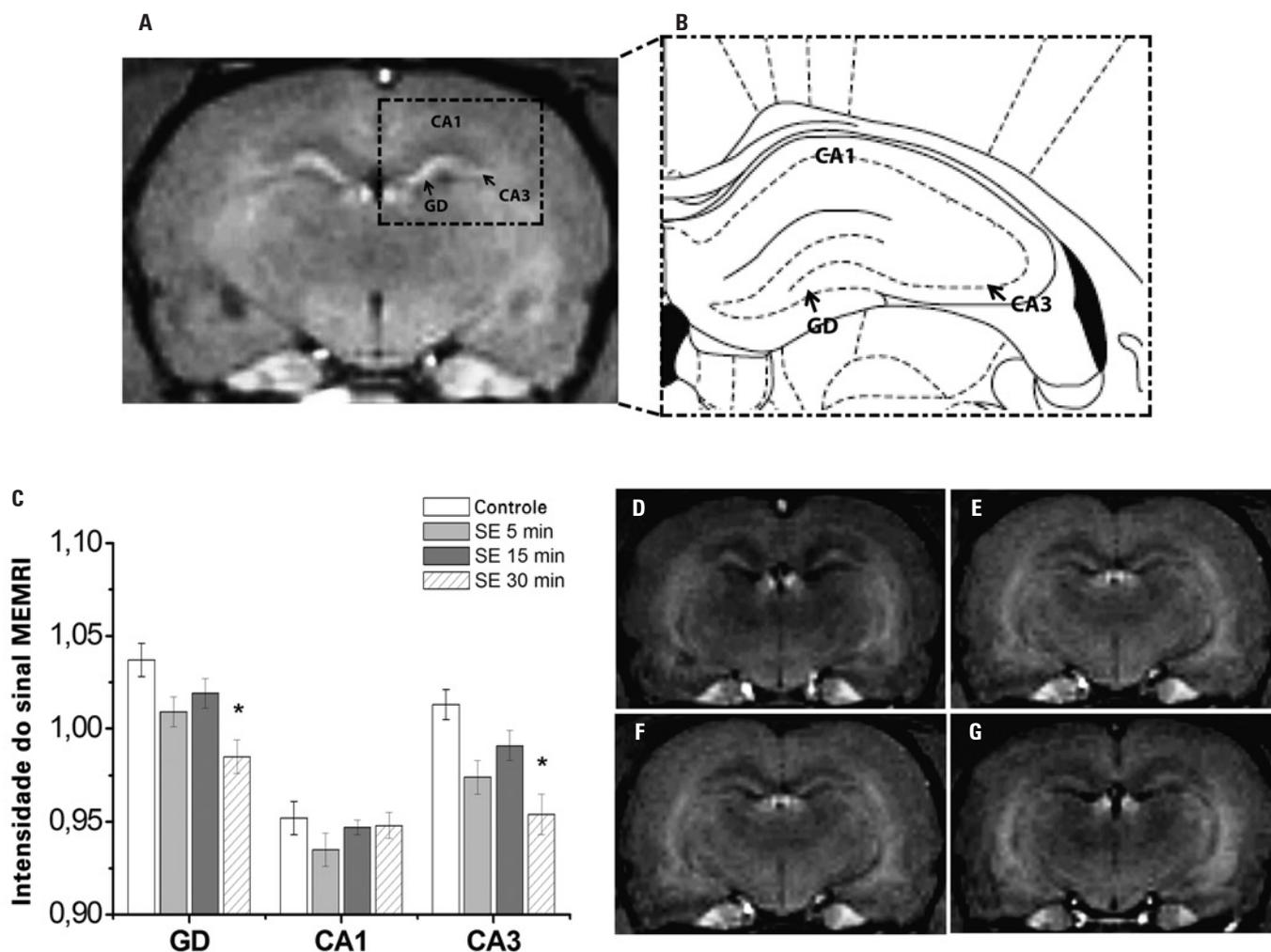


Figura 1. Em A, corte coronal de imagem por ressonância magnética de um rato controle, no qual se identificam as sub-regiões hipocâmpicas GD, CA1 e CA3, esquematizadas em B⁽¹³⁾. Em C, representações gráficas das intensidades do sinal MEMRI nos grupos estudados no GD em que foi detectada diferença entre os Grupos Controle *versus* SE-30 min (**p*<0,05); no CA1, em que não houve diferença entre os grupos, e no CA3, em que houve diferença entre os Grupos Controle *versus* SE-30 min (**p*<0,05). Os resultados apresentados incluem as análises realizadas nos hipocâmpos direito e esquerdo, uma vez que não foi detectada qualquer diferença significativa entre estes. Em D, E, F e G são mostradas imagens por ressonância magnética ponderada por T₁ utilizando cloreto de manganês como agente de contraste dos grupos controle (D), SE 5 (E), SE 15 (F) e SE 30 (G)

-3,6mm caudal ao bregma, segundo o atlas anatômico de ratos⁽¹³⁾. Os sinais foram calculados como a razão da intensidade do sinal médio na região de interesse (ROI) pela intensidade do sinal médio do corpo caloso adjacente. O aumento da intensidade do sinal relativo, quando comparado aos animais controles, foi determinado como hiperintensidade MEMRI⁽¹⁴⁾. A ROI utilizada nesse estudo, denominada GD, na verdade inclui o GD e a porção proximal do CA3, pelo fato de não ter sido possível separá-los para a realização da análise.

As imagens dos cortes histológicos foram captadas por uma câmera digital de alta resolução (Nikon DXM1200), instalada em um microscópio Nikon (Eclipse E600FN). As imagens foram adquiridas com objetiva de 10 vezes e analisadas utilizando o *software* Image J. A análise quantitativa das densidades ópticas em regiões do hipocampo foi realizada em valores expressos na forma de níveis de cinza, tendo como controle o corpo caloso. Para cada animal, foram realizadas duas medidas para cada região (CA1, CA3 e GD) nos dois lados do hipocampo (direito e esquerdo). Foram utilizados três diferentes níveis ao longo da extensão rostro-caudal do hipocampo, sendo que a iluminação foi mantida estável durante a aquisição das imagens.

Os resultados obtidos estão expressos em valores de média \pm erro padrão e foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *post-hoc* Tukey/Kramer, assumindo com $p < 0,05$ como nível de significância.

RESULTADOS

O sinal MEMRI no GD dos animais dos Grupos SE-5 ($1,009 \pm 0,008$) e SE-15 ($1,019 \pm 0,008$) não apresentou hiperintensidade MEMRI, quando estes foram comparados ao Grupo Controle ($1,037 \pm 0,009$). No Grupo SE-30, foi observada redução da intensidade de sinal MEMRI ($0,985 \pm 0,008$; $p < 0,05$) em relação ao Grupo Controle (Figura 1C).

No CA1 dos animais SE-5 ($0,935 \pm 0,009$), SE-15 ($0,947 \pm 0,004$) e SE-30 ($0,948 \pm 0,007$) não houve diferença estatística do sinal MEMRI com relação aos animais do Grupo Controle ($0,952 \pm 0,009$), (Figura 1C).

O CA3 dos animais SE-5 ($0,974 \pm 0,009$) e SE-15 ($0,991 \pm 0,008$) não apresentou diferenças, quanto à intensidade do sinal MEMRI, com relação aos animais do Grupo Controle ($1,013 \pm 0,008$). No CA3 dos animais do Grupo SE-30 ($0,954 \pm 0,011$), foi observada redução significativa ($p < 0,05$) do sinal MEMRI quando este foi comparado ao Grupo Controle (Figura 1C). As figuras 1(D-G) ilustram as IRM representativas de animais dos mesmos grupos.

A figura 2 demonstra que na região do GD, a expressão c-Fos foi intensa e diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) entre os Grupos SE-5 ($37,74 \pm 2,80$), SE-15 ($41,38 \pm 2,29$) e SE-30 ($40,57 \pm 2,04$) quando comparados ao Controle ($10,39 \pm 0,44$). Não houve diferenças significantes entre os grupos tratados com pilocarpina e mantidos em tempos crescentes de SE. O mesmo resultado foi observado para a região CA1 dos Grupos SE-5 ($26,95 \pm 1,93$), SE-15 ($30,95 \pm 1,35$), SE-30 ($26,62 \pm 1,59$) e Controle ($11,22 \pm 0,34$); e também na região do CA3 para os Grupos SE-5 ($20,65 \pm 1,76$), SE-15 ($23,66 \pm 1,24$), SE-30 ($20,11 \pm 1,34$) e Controle ($9,04 \pm 0,30$).

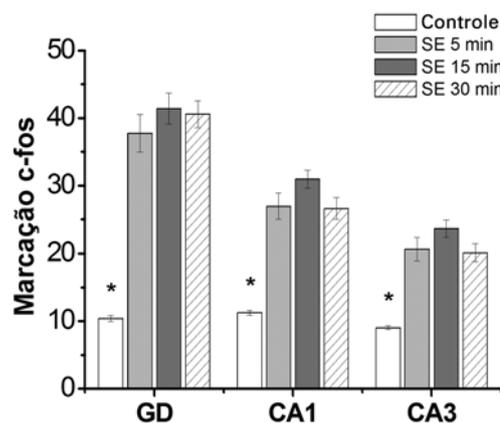


Figura 2. Representações gráficas dos resultados obtidos quanto à densitometria da expressão c-Fos nos grupos estudados nas sub-regiões hipocâmpais GD, CA1 e CA3. Foram detectadas diferenças entre todos os grupos tratados com pilocarpina e o Grupo Controle ($*p < 0,05$)

DISCUSSÃO

Utilizando o modelo da pilocarpina na fase aguda, os animais, no presente estudo, foram submetidos a diferentes durações de SE (5, 15 ou 30 minutos). Por meio da técnica MEMRI, o propósito foi analisar as áreas hipocâmpais ativadas durante o SE de curta duração e comparar tal resultado à expressão da proteína c-Fos nas mesmas áreas.

Estudos prévios mostram que 12 horas após sua injeção, o $MnCl_2$ já permeia o hipocampo de roedores^(1,2). No entanto, observou-se que os animais que permaneceram 5 ou 15 minutos em SE não apresentaram alteração na intensidade de sinal MEMRI quando comparados ao Grupo Controle. Mais interessante ainda, os animais que permaneceram mais tempo em SE (30 minutos) tiveram uma diminuição do sinal MEMRI com relação aos controles. Esses resultados corroboram resultados prévios, em que não foi possível acessar as áreas ativadas na fase aguda do modelo de ácido cálcico, após o animal ter permanecido em SE por 90 minutos⁽⁷⁾. Para explicar a redução do sinal MEMRI, os

autores propuseram que esta se devia à perda celular maciça causada pelo insulto prolongado, o que poderia ser contornado com a permanência do animal por um curto período de tempo em SE. Em estudo prévio⁽¹⁵⁾, demonstrou-se que 5 minutos de atividade epiléptica contínua no modelo da pilocarpina são suficientes para causar perda celular apenas no hilo do hipocampo, quando avaliada 2 horas após o término da crise. Outras áreas cerebrais apresentaram lesão amena quando os animais foram perfundidos 24 horas após o término do SE, que teve duração de 5 minutos. Ainda no mesmo estudo, foi demonstrado era necessário que o SE tivesse duração superior a 30 minutos para promover dano neuronal nas células piramidais e no estrato oriens do CA1 e do CA3. Nesse ponto, vale ressaltar que o SE com duração inferior a 30 minutos não é suficiente para provocar a condição epiléptica crônica⁽¹⁶⁻¹⁹⁾.

O aumento de T_1 associado à formação de edema durante o SE de 30 minutos pode ser considerado um evento capaz de diminuir o contraste proporcionado pelo Mn^{2+} e deve ser melhor investigado. Em campos magnéticos mais altos, a intensidade de sinal provocada pelo acúmulo de manganês é mais evidente. No entanto, a dose utilizada nesse trabalho em campo magnético de 2T é suficiente para o estudo da região hipocampal em modelos animais de epilepsia.

A reação imune à proteína c-Fos expressa por células em atividade, nos mesmos animais em que as IRM foram adquiridas, permitiu a avaliação da hipótese de não ativação de populações celulares específicas. A expressão da proteína c-Fos é um marcador confiável de ativação celular que se expressa rápida e transitariamente após estímulos desconhecidos para o animal. A expressão dessa proteína aparece em várias regiões cerebrais específicas após a indução de vários tipos de crises⁽¹⁷⁾.

O presente resultado demonstra intensa marcação nas regiões hipocampais do GD, CA1 e CA3 para todos os grupos tratados com pilocarpina, independentemente da duração do SE, o que indica ativação de células em todas as áreas hipocampais. No modelo de epilepsia induzida por lítio-pilocarpina, em ratos 10 dias após o nascimento, a expressão c-Fos também pôde ser verificada em várias regiões do cérebro, entre elas o CA1 e o GD, 2 horas após a indução do SE⁽¹⁷⁾.

Ao analisar crises espontâneas, de curta duração, foi demonstrado anteriormente⁽²⁰⁾ que não há expressão da proteína c-Fos. Possivelmente, tal resultado se deva ao fato de que a crise recorrente não seja um estímulo novo, nunca experimentado previamente por estas células. De acordo, Peng e Houser⁽²¹⁾ mostraram marcação c-Fos no GD após crises espontâneas em camun-

dongos. Não foi discutido pelos autores, mas é possível que a marcação dessas células esteja relacionada às células que se dividiram após o SE. Por outro lado, não há conhecimento de estudos em que o SE de curta duração seja utilizado para avaliação da expressão da proteína c-Fos. Dessa forma, o presente estudo complementa os resultados obtidos com a utilização da técnica MEMRI, mostrando que o SE de curta duração realmente ativa as áreas hipocampais do GD, CA1 e CA3.

A similaridade nos níveis de marcação da proteína c-Fos entre os grupos aqui estudados favorece a ideia de que 5 minutos de atividade epiléptica contínua, induzida por pilocarpina, são suficientes para promover ativação celular generalizada no hipocampo. Uma vez que todas as células, ou a maioria delas, já foram ativadas, maiores durações do SE não resultarão em maior marcação. Dessa forma, tais resultados indicam que a redução do sinal MEMRI nesse protocolo experimental não pode estar relacionada à quantidade de células ativadas.

CONCLUSÃO

Os resultados mostram que o SE de curta duração não altera a intensidade de sinal MEMRI na fase aguda do modelo de pilocarpina. A análise histológica da expressão da proteína c-Fos, indica que, nos tempos estudados, houve ativação celular nas regiões do GD, CA1 e CA3. Os elementos envolvidos no MEMRI, que parecem estar alterados e, portanto, não permitiram a formação do realce após a atividade epiléptica contínua induzida, ainda devem ser estudados e constituem alvos de investigações futuras.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 05/56663-1; 07/52911-6) pelo apoio financeiro para execução deste estudo.

REFERÊNCIAS

1. Alvestad S, Goa PE, Qu H, Risa O, Brekken C, Sonnewald U, et al. In vivo mapping of temporospatial changes in manganese enhancement in rat brain during epileptogenesis. *Neuroimage*. 2007;38(1):57-66.
2. Immonen RJ, Kharatishvili I, Sierra A, Einula C, Pitkänen A, Gröhn OH. Manganese enhanced MRI detects mossy fiber sprouting rather than neurodegeneration, gliosis or seizure-activity in the epileptic rat hippocampus. *Neuroimage*. 2008;40(4):1718-30.
3. Nairismägi J, Pitkänen A, Narkilahti S, Huttunen J, Kauppinen RA, Gröhn OH. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging of mossy fiber plasticity in vivo. *Neuroimage*. 2006;30(1):130-5.
4. Silva AC, Lee JH, Aoki I, Koretsky AP. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI): methodological and practical considerations. *NMR in Biomed*. 2004;17(8):532-43.

5. Yu X, Wadghiri YZ, Sanes DH, Turnbull DH. In vivo auditory brain mapping in mice with Mn-enhanced MRI. *Nat Neurosci.* 2005;8(7):961-8.
6. Muldoon LL, Sàndor M, Pinkston KE, Neuwelt EA. Imaging, distribution, and toxicity of superparamagnetic iron oxide magnetic resonance nanoparticles in the rat brain and intracerebral tumor. *Neurosurgery.* 2005;57(4):785-96.
7. Mello LE, Covolan L. Neuronal injury and progressive cell damage. In: Schwartzkroin PA, editor. *Encyclopedia of basic epilepsy research.* Oxford: Academic Press; 2009. p. 125-8.
8. Morita H, Ogino T, Fujiki N, Tanaka K, Gotoh TM, Seo Y, et al. Sequence of forebrain activation induced by intraventricular injection of hypertonic NaCl detected by Mn²⁺ contrasted T1-weighted MRI. *Auton Neurosci.* 2004; 113(1-2):43-54.
9. Mello LE, Covolan L. Spontaneous seizures preferentially injure interneurons in the pilocarpine model of chronic spontaneous seizures. *Epilepsy Res.* 1996; 26(1):123-9.
10. Racine RJ, Gartner JG, Burnhan WM. Epileptiform activity and neural plasticity in limbic structures. *Brain Res.* 1972;47(1):262-8.
11. Mello LE, Kohman CM, Tan AM, Cavalheiro EA, Finch DM. Lack of Fos-like immunoreactivity after spontaneous seizures or reinduction of status epilepticus by pilocarpine in rats. *Neurosci Lett.* 1996;208(2):133-7.
12. Swanson LW. *Brain maps: structure of the rat brain.* Amsterdam: Elsevier; 1992.
13. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Oxford: Academic Press; 1998.
14. Lee JH, Silva AC, Merkle H, Koretsky AP. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging of mouse brain after systemic administration of MnCl₂: dose-dependent and temporal evolution of T1 contrast. *Magn Reson Med.* 2005;53(3):640-8.
15. Lemos T, Cavalheiro EA. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. *Exp Brain Res.* 1995;102(3):423-8.
16. Dragunow M, Faull R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods.* 1989;29(3):261-5.
17. Dubé C, André V, Covolan L, Ferrandon A, Marescaux C, Nehlig A. C-Fos, Jun D and HSP72 immunoreactivity, and neuronal injury following lithium-pilocarpine induced status epilepticus in immature and adults rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998;63(1):139-54.
18. Morgan JI, Curran T. Proto-oncogene transcription factors and epilepsy. *Trends Pharmacol Sci.* 1991;12(9):343-9.
19. Motte J, Fernandes MJ, Baram TZ, Nehlig A. Spatial and temporal evolution of neuronal activation, stress and injury in the lithium-pilocarpine seizures in adult rats. *Brain Res.* 1998;793(1-2):61-72.
20. Mello LE, Kohman CM, Tan AM, Cavalheiro EA, Finch DM. Lack of Fos-like immunoreactivity after spontaneous seizures or reinduction of status epilepticus by pilocarpine in rats. *Neurosci Lett.* 1996;208(2):133-7.
21. Peng Z, Houser CR. Temporal patterns of fos expression in the dentate gyrus after spontaneous seizures in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci.* 2005;25(31):7210-20.