

## Interacción entre Las Vías de Señalización de Receptores Serotoninérgicos y $\beta$ -Adrenérgicos en La Arteria Femoral de Ratones

Maria Andréia Delbin<sup>1</sup>, Alexandre Sérgio Silva<sup>1</sup>, Edson Antunes<sup>2</sup>, Angelina Zanescio<sup>1</sup>

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)<sup>1</sup>, São Paulo, SP; Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)<sup>2</sup>, Campinas, SP, Brasil

### Resumen

**Fundamento:** La enfermedad coronaria ha sido ampliamente estudiada en las investigaciones cardiovasculares. Sin embargo, los pacientes con enfermedad arterial periférica (EAP), tienen los peores resultados en comparación con aquellos con la enfermedad arterial coronaria. Por tanto, los estudios farmacológicos con la arteria femoral son extremadamente importantes para obtener una mejor comprensión de las respuestas clínicas y fisiopatológicas de la EAP.

**Objetivo:** Evaluar las propiedades farmacológicas de los agentes contráctiles y relajantes en la arteria femoral de los ratones.

**Métodos:** Las curvas de concentración-respuesta a los agentes contráctiles fenilefrina (FE) y a la serotonina (5-HT) y los agentes relajantes isoproterenol (ISO) y forskolina, se obtuvieron en la arteria femoral de ratones ya aislada. Para las respuestas a la relajación, los tejidos fueron contraídos con FE o 5-HT.

**Resultados:** La potencia de clasificación en la arteria femoral fue de 5-HT > FE para las respuestas contráctiles. En los tejidos contraídos con 5-HT, las respuestas de relajación al isoproterenol fueron prácticamente eliminadas en comparación con los tejidos contraídos con FE. La forskolina, un estimulante de la adenilil ciclasa, restauró parcialmente la respuesta de relajación al ISO en los tejidos contraídos con 5-HT.

**Conclusión:** Ocurre una interacción entre las vías de señalización de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y serotoninérgicos en la arteria femoral. Además, esa investigación suministra un nuevo modelo para estudiar las vías de señalización serotoninérgicas en condiciones normales y patológicas que puedan ayudar a comprender los resultados clínicos en la EAP. (Arq Bras Cardiol 2012;98(1):29-34)

**Palabras clave:** Enfermedad arterial periférica, arteria femoral/fisiopatología, receptores adrenérgicos/alfa, receptores adrenérgicos/beta, receptores de serotonina.

### Introducción

Una importante rama de la arteria ilíaca, la arteria femoral, irriga los músculos de los miembros inferiores y los tejidos periféricos, siendo un vaso sanguíneo único, con una conducción larga, de alta resistencia de flujo y con una fuerte relevancia para las intervenciones médicas<sup>1</sup>. De hecho, aproximadamente un 50% de las enfermedades arteriales oclusivas (EAO) ocurren en la arteria femoral, pudiendo conllevar a una claudicación intermitente y a una isquemia crítica del miembro, con un daño significativo para las actividades diarias de los pacientes<sup>2</sup>. El apareamiento de la enfermedad arterial periférica (EAP), ha aumentado en la población mundial y se han hecho ostensibles esfuerzos para intentar mejorar las consecuencias no favorables de la intervención médica en el tratamiento a largo plazo. Además de eso, factores

como el tabaquismo, la dislipidemia, la diabetes mellitus, la arteriosclerosis y la edad avanzada, han sido involucrados en la patogénesis de la EAP<sup>3,4</sup>. Aunque la mayoría de las investigaciones cardiovasculares se haya concentrado en la enfermedad coronaria, tales como los avances en las intervenciones quirúrgicas y el descubrimiento de nuevas terapias farmacológicas, los pacientes con EAP gozan de los peores resultados en comparación con aquellos con la enfermedad de la arteria coronaria<sup>5</sup>. Por esa razón, los estudios farmacológicos con la arteria femoral son muy importantes para obtener una mejor comprensión de las respuestas clínicas y fisiopatológicas de la EAP.

Sabemos que la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) desempeña funciones biológicas importantes en el sistema cardiovascular, incluyendo la agregación plaquetaria, bradicardia o la taquicardia, hipotensión o la hipertensión y la vasodilatación o la vasoconstricción<sup>6,7</sup>. La diversidad de las acciones funcionales de la 5-HT se relaciona con el número de subtipos de receptores, como también con la complejidad de la vía de señalización que está involucrada en las respuestas. En ese sentido, por lo menos 15 subtipos

Correspondencia: Maria Andréia Delbin •

Av. 24A 1515, Bela Vista – 13990000 - Rio Claro, São Paulo, Brasil  
E-mail: nadelbin@hotmail.com

Artículo recibido el 28/04/11; revisado recibido el 29/06/11; aceptado el 30/06/11.

de receptores 5-HT han sido caracterizados, que a su vez se subdividen en siete familias de receptores, de acuerdo con las propiedades farmacológicas, las secuencias de aminoácidos, la organización de los genes y las vías de acoplamiento del segundo mensajero<sup>8,9</sup>. Las familias de receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub> se acoplan a las G-proteínas, mientras que los receptores 5-HT<sub>3</sub> son canales iónicos asociados a la 5-HT. Entre los receptores 5-HT, los subtipos 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub> realizan un papel importante en la regulación del sistema cardiovascular, en que la familia del receptor 5-HT<sub>1</sub> está ligada principalmente a la proteína G inhibitoria (Gi/o), que impide la formación de la adenosina monofosfato cíclico (AMPc), mientras que la familia de receptores 5-HT<sub>2</sub> está acoplada preferentemente a las proteínas Gq/11, conllevando a la activación de la vía de señalización IP3/PKC/citosólica [Ca<sup>2+</sup>]<sup>10</sup>. Tanto la familia del receptor 5-HT<sub>1</sub> como la de 5-HT<sub>2</sub> se asocian a la contracción del músculo liso vascular y a la formación del trombo<sup>9,11</sup>.

La activación de los receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos por catecolaminas también produce una serie de respuestas funcionales en el sistema cardiovascular, incluyendo las respuestas cronotrópicas positivas y el control del tono vascular<sup>12,13</sup>. La vasoconstricción mediada por el receptor  $\alpha$ -adrenérgico, ha sido ampliamente estudiada en las condiciones normales y patológicas<sup>14-16</sup>, pero pocos estudios evalúan la vasodilatación mediada por los receptores  $\beta$ -adrenérgicos<sup>17,18</sup>. En ese sentido, por lo menos tres subtipos de receptores  $\beta$ -adrenérgicos median las respuestas de relajación en los tejidos vasculares y se acoplan a la proteína Gs, conllevando a la activación de la vía de señalización de la proteína quinasa (PK) dependiente de AMPc<sup>19</sup>.

Las vías de señalización de los receptores serotoninérgicos o adrenérgicos son dianas para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, incluyendo la insuficiencia cardíaca, la hipertensión arterial, la enfermedad coronaria y la EAP<sup>4,20</sup>. Así, los estudios farmacológicos sobre pequeñas arterias y las interacciones entre los fármacos, involucrando las vías de señalización de los receptores serotoninérgicos y adrenérgicos, son cruciales para el desarrollo de nuevos compuestos en un intento de mejorar la calidad de vida de los pacientes con enfermedades vasculares. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar las propiedades farmacológicas de los agentes contráctiles (5-HT y fenilefrina) y los relajantes (isoproterenol y forskolina), en el segmento proximal de la arteria femoral de los ratones.

## Métodos

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidade de Campinas (UNICAMP), bajo el N° de protocolo 1307-1.

## Animales

Ratones Wistar machos (407, 6g) que se alojaron individualmente en 26 ± 2 °C, con alimentos y agua *ad libitum* (a su gusto), y en 12h de luz (ciclo oscuro y con las luces encendidas a las 6h). Además, se sometieron a la inhalación de CO<sub>2</sub>, y fueron sacrificados por decapitación y sangrados.

## Anillos aislados de la arteria femoral de ratones

La arteria femoral fue rápidamente retirada y puesta en una solución tampón de Krebs-Henseleit, refrigerada con la siguiente composición (mM): NaCl 118, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.17, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 25 y glucosa 5.6. El segmento proximal de la arteria femoral se aisló, y dos anillos (de aproximadamente 2 mm de largura), fueron retirados y montados en una cámara de órganos de 5 ml. Un miógrafo para la grabación de la fuerza isométrica (Danish Myo Technology, modelo 610m, Aarhus N, Dinamarca), se acopló a un sistema de adquisición, con el software específico (PowerLab 30/08, LabChart 7, ADInstruments, Sydney-NSW, Australia). La solución de baño se mantuvo a 37°C y fue continuamente gasificada con un 95%-O<sub>2</sub> y un 5%-CO<sub>2</sub>, y con un pH de 7.4. Los tejidos fueron estabilizados por 60 minutos, bajo una tensión de reposo de 1 mN<sup>21</sup>.

## Curvas concentración-respuesta a los agentes contráctiles

Posteriormente al período de equilibrio, los anillos fueron contraídos con KCl 80 mM, para verificar la viabilidad del tejido y fueron lavados con Krebs. Además de eso, fueron contraídos con fenilefrina (FE, 1 mM) y relajados con acetilcolina (ACH, 1  $\mu$ M), para confirmar la integridad del endotelio. Los anillos sin respuestas contráctiles o relajantes se eliminaron.

Con el fin de evaluar las respuestas contráctiles mediadas por los receptores serotoninérgicos y  $\alpha$ -adrenérgicos, las curvas acumulativas concentración-respuesta a la 5-hidroxitriptamina (5-HT: 1 nM - 100 mM) y a la fenilefrina (FE: 1 nM - 100 mM), fueron construidas en el segmento proximal de los anillos de la arteria femoral<sup>22</sup>.

Las curvas concentración-respuesta al isoproterenol (1 nM - 10 mM) se obtuvieron en los tejidos contraídos con FE (1 mM) o con 5-HT (10 mM), para analizar la interacción entre la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y la de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos o serotoninérgicos. También realizamos curvas concentración-respuesta para el activador adenilato ciclasa y la forskolina (1 nM - 100  $\mu$ M), en los anillos femorales, con el fin de determinar si las interacciones medicamentosas pueden darse en el nivel del receptor o en los niveles superiores.

Todos los datos de concentración-respuesta fueron evaluados para ajustarlos en una función logística con la fórmula:  $E = E_{max}/((1 + (10^x/10^n)^n) + F)$ , en que E es el efecto del basal por encima; E<sub>max</sub> es la respuesta máxima producida por el agonista; c es el logaritmo de la EC<sub>50</sub>, concentración del agonista que produce la mitad del máximo de respuesta; x es el logaritmo de la concentración del agonista; n es un parámetro de ajuste de curvas que define la inclinación de la línea de respuesta de concentración; y F es la respuesta observada en ausencia del agonista añadido. El análisis de regresión no lineal fue utilizado para determinar los parámetros E<sub>max</sub> y log EC<sub>50</sub>, utilizando GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA), con la restricción de que F = 0. Las respuestas para cada agonista quedan demostradas como el promedio ± EPM de potencia (pEC<sub>50</sub>) y respuesta máxima (E<sub>max</sub>). Las relaciones fueron plotadas como porcentajes de las contracciones inducidas por la FE

o 5-HT, y las respuestas contráctiles fueron plotadas como porcentaje de la concentración inducida por KCl (80 mM).

### Análisis estadístico

Los datos están expresados como promedio  $\pm$  EPM de experimentos *n*. El test *t* de Student pareado o no pareado, se hizo por medio de un software específico (InStat, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Los valores de *p* inferiores a 0,05 fueron considerados como estadísticamente significativos.

### Fármacos

El cloruro de acetilcolina, hidrocloreto de fenilefrina, 5-hidroxitriptamina, forskolina y el isoproterenol, se adquirieron por Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA).

## Resultados

### Respuestas contráctiles

Tanto la 5-HT como la FE generaron respuestas contráctiles dependientes de la concentración en anillos de arteria femoral (Figura 1A). La potencia de la 5-HT fue significativamente mayor en comparación con la FE agonista- $\alpha_1$  (cerca de 20 veces), en el segmento proximal de la arteria femoral de ratones. No fueron encontradas diferencias en las respuestas máximas para ambos agonistas. Esos datos aparecen resumidos en la Tabla 1.

### Respuestas de relajación

En otro conjunto de experimentos, evaluamos las respuestas de relajación para el isoproterenol agonista  $\beta$ -adrenérgico, en que los anillos de la arteria femoral fueron contraídos con FE (10  $\mu$ M) o 5-HT (1  $\mu$ M). En los anillos contraídos con FE, el

isoproterenol produjo respuestas de relajación dependientes de la concentración. Sin embargo, en los anillos contraídos con 5-HT, el isoproterenol indicó una respuesta de relajación inferior en los anillos de la arteria femoral con relación a los anillos pareados contraídos con FE (Figura 1B). Para comprobar la hipótesis de que los tejidos contraídos con 5-HT afectaban el nivel de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos o los nieles superiores (vía de señalización), curvas de concentración-respuesta para el activador de la adenilil ciclasa forskolina se obtuvieron en los anillos de la arteria femoral contraídos con FE (10  $\mu$ M) o 5-HT (1  $\mu$ M). En los anillos contraídos con FE, la forskolina produjo respuestas de relajación dependientes de la concentración. Sin embargo, un desplazamiento paralelo dextral, de aproximadamente nueve veces, fue observado en las curvas de concentración-respuesta para la forskolina en tejidos contraídos con 5-HT, en comparación con los anillos pareados de la arteria femoral contraídos con FE (Figura 1C). No se encontraron diferencias en las respuestas máximas para el activador de la adenilil ciclasa en contracción con dos agentes. Esos datos están resumidos en la Tabla 1.

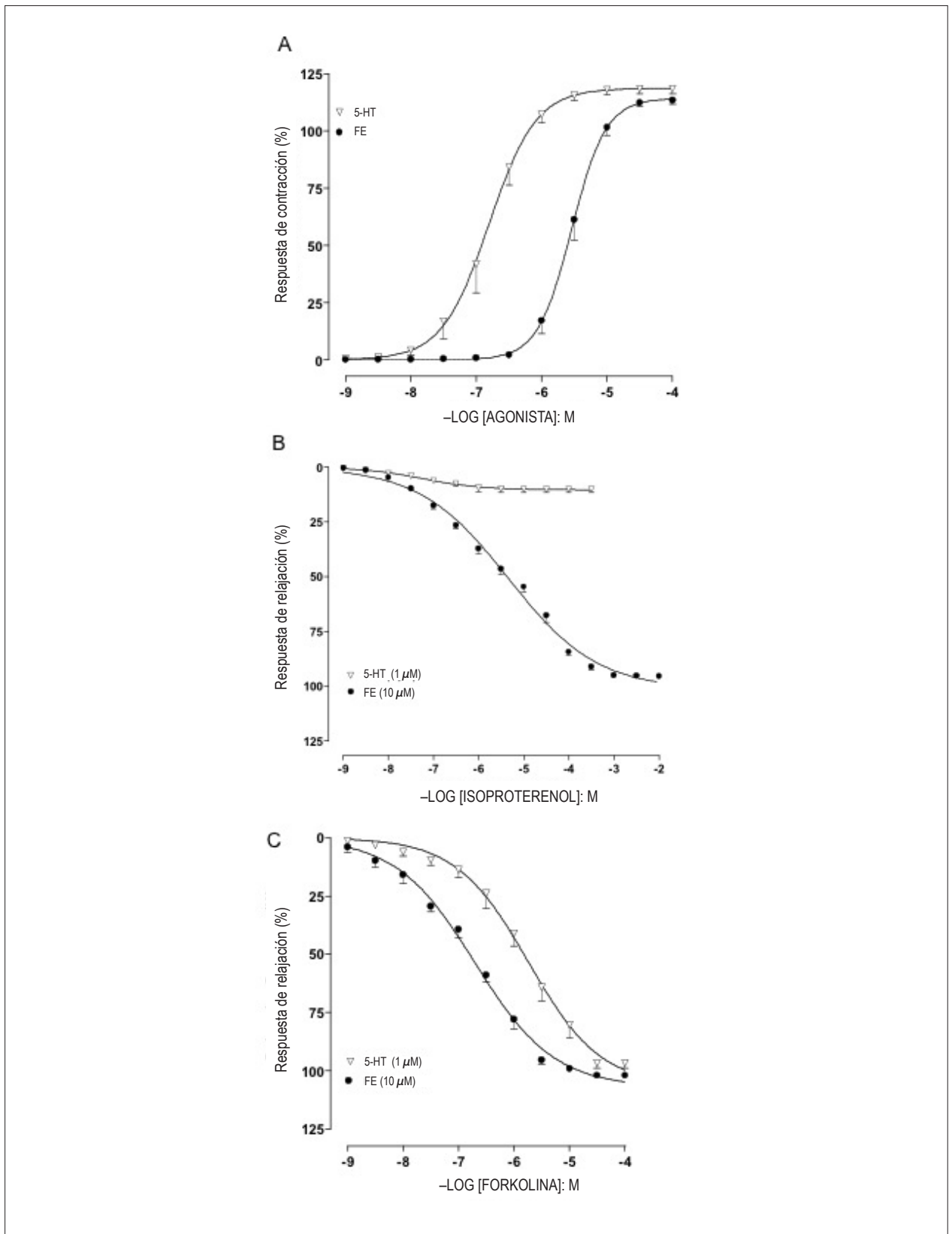
## Discusión

En este estudio pudimos observar, que la potencia de orden de clasificación en el segmento proximal de la arteria femoral fue de 5-HT > FE, para las respuestas contráctiles pudiendo reflejar una mayor densidad de los receptores serotoninérgicos o una elevada eficacia del mecanismo de vía de señalización en esa preparación, en contraste con la vía descendente de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos/AMPC/PK. Curiosamente, un estudio anterior encontró una potencia de clasificación similar para la 5-HT en diferentes anillos arteriales, incluyendo los anillos mesentéricos, caudales y basilares<sup>23</sup>. Además, la potencia de 5-HT encontrada en nuestro estudio para el segmento proximal en la arteria femoral (6,86) estuvo

**Tabla 1 - Valores de potencia ( $pEC_{50}$ ) y respuestas máximas ( $E_{max}$ ) obtenidas a partir de curvas concentración-respuesta a la fenilefrina (FE), a la 5-hidroxitriptamina (5-HT), al isoproterenol (ISO) y a la forskolina en los anillos de la arteria femoral de ratones contraídos con FE o 5-HT**

	$pEC_{50}$	$E_{max}$
<b>Respuestas contráctiles</b>		
FE	5.50 $\pm$ 0.04 (10)	114 $\pm$ 2
5-HT	6.86 $\pm$ 0.01 (8)*	119 $\pm$ 2
<b>Respuestas de relajación</b>		
ISO (contracción con FE)	5.33 $\pm$ 0.08 (6)	95 $\pm$ 2
ISO (contracción con 5-HT)	ND (4)	10 $\pm$ 1 <sup>†</sup>
Forskolina (contracción con FE)	6.70 $\pm$ 0.06 (4)	102 $\pm$ 1
Forskolina (contracción con 5-HT)	5.74 $\pm$ 0.07(5) <sup>†</sup>	96 $\pm$ 1

La potencia está representada como -log de la concentración molar para producir un 50% de la respuesta máxima. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM de 4-10 experimentos. ND - no determinado. El número de experimentos aparece entre paréntesis. \*  $p < 0,05$  en comparación con las respuestas contráctiles de la FE. <sup>†</sup>  $p < 0,05$  en comparación con la relajación ISO en los tejidos contraídos con FE. <sup>‡</sup>  $p < 0,05$  en comparación con la relajación de la forskolina en los tejidos contraídos con FE.



**Figura 1** - Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina (●FE, n = 10) y a la 5-hidroxitriptamina (▽5-HT, n = 08) en la arteria femoral de ratones (panel A). Relajación inducida por el isoproterenol contraído con FE (10 μM, n = 06, ●) ó 5-HT (1 μM; N = 4, ▽) en la arteria femoral de ratones (panel B). Relajación inducida por la forskolina contraída con FE (10 μM, n = 04, ●) ó 5-HT (1 μM; n = 5, ▽) en la arteria femoral de ratones (panel C). Los datos son promedios ± SEM.

íntimamente relacionada con los resultados obtenidos en la arteria basilar (6,88), indicando que ambas preparaciones presentan grandes similitudes en las propiedades farmacológicas. Además, las evidencias clínicas demuestran que la EAP es más común en los pacientes con jaqueca que en los pacientes no afectados por la cefalea<sup>24,25</sup>. En su totalidad, nuestros datos demuestran que la arteria femoral es un interesante modelo para el estudio de las vías de señalización de los receptores serotoninérgicos en condiciones normales y patológicas, como diabetes mellitus y la arteriosclerosis.

En este estudio, también descubrimos que los tejidos contraídos con 5-HT prácticamente eliminaron la respuesta de relajación para el isoproterenol (10% de respuestas máximas), habiendo sido parcialmente restaurados por la forskolina, como estimulante de acción directa de la guanilato ciclasa que ignora a los  $\beta$ -adrenérgicos. Por tanto, nuestros resultados demuestran una interacción entre las vías de señalización de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y serotoninérgicos en la arteria femoral. En ese sentido, un estudio anterior arrojó una interacción entre el receptor  $\beta$ -adrenérgico y la 5-HT<sub>1</sub> en la liberación de glutamato en los terminales del nervio cerebrocortical<sup>26</sup>. Por lo tanto, nuestros datos refuerzan el postulado de que el segmento proximal de la arteria femoral es un tejido vascular interesante para estudiar a los receptores de 5-HT y la compleja vía de señalización. Sin embargo, no podemos determinar, a partir de este estudio, que el subtipo de receptor 5-HT media la respuesta contráctil o los efectores de transducción que contribuyen para la supresión de la relajación de mediación del receptor  $\beta$ -adrenérgico en la arteria femoral de ratones. Algunas evidencias nos indican que la familia de receptores 5-HT<sub>1</sub> está fundamentalmente vinculada a la G<sub>i/o</sub>, proteína sensible a la toxina pertussis y negativamente asociada a la adenilil ciclasa<sup>9</sup>. Por otro lado, la activación del receptor  $\beta$ -adrenérgico está acoplada a la proteína G<sub>s</sub> que, a su vez, conlleva a la activación de la vía

de señalización AMPC/PK en el sistema cardiovascular<sup>19</sup>. Por tanto, la interacción antagónica entre los receptores 5-HT y  $\beta$ -adrenérgicos, puede darse en el receptor acoplado a la proteína G, como también en el nivel de los sustratos de PK, teniendo en cuenta que la forskolina restauró parcialmente la supresión de la relajación de mediación del receptor  $\beta$ -adrenérgico en los anillos de la arteria femoral de ratones contraídos con 5-HT. El significado funcional de esos datos puede estar relacionado con el apareamiento de la enfermedad vascular y de la administración de agonistas de 5-HT/bloqueadores de captación de 5-HT en algunas enfermedades como la jaqueca y la obesidad.

## Conclusión

Como conclusión, nuestros datos revelaron claramente que ocurre una interacción entre las vías de señalización de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y serotoninérgicos en los anillos de la arteria femoral de ratones. Además, este estudio suministra una perspectiva interesante para el estudio de las vías de señalización de los receptores serotoninérgicos en condiciones normales y patológicas, en un intento de mejorar los resultados clínicos en pacientes con EAP.

## Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

## Fuentes de Financiación

FAPESP financió el presente estudio.

## Vinculación Académica

Este artículo forma parte de tesis de Doctorado de Alexandre Sérgio Silva, por Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho e Universidade Estadual de Campinas.

## Referencias

1. Mewissen MW. Stenting in the femoropopliteal arterial segment. *Tech Vasc Interv Radiol*. 2005;8(4):146-9.
2. Schainfield RM. Management of peripheral arterial disease and intermittent claudication. *J Am Board Fam Pract*. 2001;14(6):443-50.
3. Balzer JO, Scheinert D, Diebold T, Haufe M, Vogl TJ, Biamino G. Postinterventional transcatheter suture of femoral artery access sites in patients with peripheral arterial occlusive disease: a study of 930 patients. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2001;53(2):174-81.
4. Lumsden AB, Rice TW, Chen C, Zhou W, Lin PH, Bray P, et al. Peripheral arterial occlusive disease: magnetic resonance imaging and the role of aggressive medical management. *World J Surg*. 2007; 31(4):695-704.
5. Mardikar HM, Mukherjee D. Current endovascular treatment of peripheral arterial disease. *Prog Cardiovasc Nurs*. 2007;22(1):31-7.
6. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;71(4):533-54.
7. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med*. 2009;60:355-66.
8. Kaumann AJ, Levy FO. 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther*. 2006;111(3):674-706.
9. Hannon J, Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res*. 2008;195(1):198-213.
10. Martin GR, Eglen RM, Hamblin MW, Hoyer D, Yocca F. The structure and signalling properties of 5-HT receptors: an endless diversity? *Trends Pharmacol Sci*. 1998;19(1):2-4.
11. Nagatomo T, Rashid M, Abul Muntasir H, Komiyama T. Functions of 5-HT<sub>2A</sub> receptor and its antagonists in the cardiovascular system. *Pharmacol Ther*. 2004;104(1):59-81.
12. Insel PA. Adrenergic receptors: evolving concepts on structure and function. *Am J Hypertens*. 1989;2(3 Pt 2):112S-85S.
13. Lefkowitz RJ, Rockman HA, Koch WJ. Catecholamines, cardiac beta-adrenergic receptors, and heart failure. *Circulation*. 2000;101(14):1634-7.
14. Zanesco A, De-Moraes S. Effect of acute footshock stress on the responsiveness of the isolated rat tail artery to phenylephrine and epinephrine. *Braz J Med Biol Res*. 1992;25(1):63-6.

15. Docherty JR. Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.* 1998;361(1):1-15.
16. Rocha ML, Kihara AH, Davel AP, Britto LR, Rossoni LV, Bendhack LM. Blood pressure variability increases connexin expression in the vascular smooth muscle of rats. *Cardiovasc Res.* 2008;80(1):123-30.
17. Chiba S, Tsukada M. Vascular responses to beta-adrenoceptor subtype-selective agonists with and without endothelium in rat common carotid arteries. *J Auton Pharmacol.* 2001;21(1):7-13.
18. Matsushita M, Tanaka Y, Koike K. Studies on the mechanisms underlying beta-adrenoceptor-mediated relaxation of rat abdominal aorta. *J Smooth Muscle Res.* 2006;42(6):217-25.
19. Guimaraes S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev.* 2001;53(2):319-56.
20. Mbaki Y, Ramage AG. Investigation of the role of 5-HT2 receptor subtypes in the control of the bladder and the urethra in the anaesthetized female rat. *Br J Pharmacol.* 2008;155(3):343-56.
21. Drescher W, Varoga D, Liebs TR, Lohse J, Herdegen T, Hassenpflug JI, et al. Femoral artery constriction by norepinephrine is enhanced by methylprednisolone in a rat model. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;8(Suppl. 3):162-6.
22. Van Rossum JM. Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1963;143:299-330.
23. Gupta S, Mehrotra S, Villalón C, De Vries R, Garrelds I, Saxena P, et al. Effects of female sex hormones on responses to CGRP, acetylcholine, and 5-HT in rat isolated arteries. *Headache.* 2007;47(4):564-75.
24. Halloul Z, Meyer F, Lippert H, Buerger T. Ergotamine-induced acute vascular insufficiency of the lower limb—a case report. *Angiology.* 2001;52(3):217-21.
25. Jumo ME, Chevtchouk L, Nunes AA, de Rezende DF, Jevoux Cda C, de Souza JA, et al. Ankle-brachial index, a screening for peripheral obstructive arterial disease, and migraine - a controlled study. *Headache.* 2010;50(4):626-30.
26. Wang SJ, Coutinho V, Sihra TS. Presynaptic cross-talk of beta-adrenoreceptor and 5-hydroxytryptamine receptor signalling in the modulation of glutamate release from cerebrocortical nerve terminals. *Br J Pharmacol.* 2002;137(8):1371-9.