

Interação entre as Vias de Sinalização de Receptores Serotoninérgicos e β -Adrenérgicos em Artéria Femoral de Ratos

Interaction between Serotonergic and β -adrenergic Receptors Signaling Pathways in Rat Femoral Artery

Maria Andréia Delbin¹, Alexandre Sérgio Silva¹, Edson Antunes², Angelina Zanescó¹

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

Resumo

Fundamento: A doença coronária tem sido amplamente estudada em pesquisas cardiovasculares. No entanto, pacientes com doença arterial periférica (DAP) têm piores resultados em comparação àqueles com doença arterial coronariana. Portanto, os estudos farmacológicos com artéria femoral são altamente relevantes para a melhor compreensão das respostas clínicas e fisiopatológicas da DAP.

Objetivo: Avaliar as propriedades farmacológicas dos agentes contráteis e relaxantes na artéria femoral de ratos.

Métodos: As curvas concentração-resposta aos agentes contráteis fenilefrina (FE) e serotonina (5-HT) e os agentes relaxantes isoproterenol (ISO) e forskolina foram obtidos na artéria femoral de ratos isolada. Para as respostas ao relaxamento, os tecidos foram contraídos com FE ou 5-HT.

Resultados: A potência de classificação na artéria femoral foi de 5-HT > FE para as respostas contráteis. Em tecidos contraídos com 5-HT, as respostas de relaxamento ao isoproterenol foram praticamente abolidas em comparação aos tecidos contraídos com FE. A forskolina, um estimulante da adenilil ciclase, restaurou parcialmente a resposta de relaxamento ao ISO em tecidos contraídos com 5-HT.

Conclusão: Ocorre uma interação entre as vias de sinalização dos receptores β -adrenérgicos e serotoninérgicos na artéria femoral. Além disso, esta pesquisa fornece um novo modelo para estudar as vias de sinalização serotoninérgicas em condições normais e patológicas que podem ajudar a compreender os resultados clínicos na DAP. (Arq Bras Cardiol 2012;98(1):29-34)

Palavras-chave: Doença arterial periférica, artéria femoral/fisiopatologia, receptores adrenérgicos/alfa, receptores adrenérgicos/beta, receptores de serotonina.

Abstract

Background: Coronary heart disease has been widely studied in cardiovascular research. However, patients with peripheral artery disease (PAD) have worst outcomes compared to those with coronary artery disease. Therefore, pharmacological studies using femoral artery are highly relevant for a better understanding of the pathophysiologic responses of the PAD.

Objective: The aim of this study was to evaluate the pharmacologic properties of the contractile and relaxing agents in rat femoral artery.

Methods: Concentration response curves to the contractile phenylephrine (PE) and serotonin (5-HT) and the relaxing agents isoproterenol (ISO) and forskolin were obtained in isolated rat femoral artery. For relaxing responses, tissues were precontracted with PE or 5-HT.

Results: The order rank potency in femoral artery was 5-HT > PE for contractile responses. In tissues precontracted with 5-HT, relaxing responses to isoproterenol was virtually abolished as compared to PE-contracted tissues. Forskolol, a stimulant of adenylyl cyclase, partially restored the relaxing response to ISO in 5-HT-precontracted tissues.

Conclusion: An interaction between β -adrenergic- and serotonergic- receptors signaling pathway occurs in femoral artery. Moreover, this study provides a new model to study serotonergic signaling pathway under normal and pathological conditions which can help understanding clinical outcomes in the PAD. (Arq Bras Cardiol 2012;98(1):29-34)

Keywords: Peripheral arterial disease, femoral artery/physiopathology, receptors, adrenergic/alpha, receptors, adrenergic/beta, receptors, serotonin.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Maria Andreia Delbin •

Av. 24A 1515, Bela Vista – 13990000 - Rio Claro, São Paulo, Brasil

E-mail: nadelbin@hotmail.com

Artigo recebido em 28/04/11; revisado recebido em 29/06/11; aceito em 30/06/11.

Introdução

Importante ramo da artéria ilíaca, a artéria femoral irriga os músculos dos membros inferiores e os tecidos periféricos, sendo um vaso sanguíneo único, com uma condução longa, de alta resistência de fluxo e com uma relevância marcante para intervenções médicas¹. De fato, aproximadamente 50% das doenças arteriais oclusivas (DAO) ocorrem na artéria femoral, podendo resultar em claudicação intermitente e isquemia crítica do membro, com prejuízo significativo às atividades diárias dos pacientes². A incidência de doença arterial periférica (DAP) tem aumentado na população mundial, e consideráveis esforços têm sido envidados para melhorar as consequências desfavoráveis da intervenção médica no tratamento de longo prazo. Além disso, fatores como tabagismo, dislipidemia, diabetes melito, aterosclerose e idade avançada têm sido implicados na patogênese da DAP^{3,4}. Embora a maioria das pesquisas cardiovasculares tenha se voltado para a doença coronária, tais como avanços em intervenções cirúrgicas e descoberta de novas terapias farmacológicas, os pacientes com DAP têm piores resultados em comparação àqueles com doença da artéria coronária⁵. Por essa razão, os estudos farmacológicos com artéria femoral são altamente relevantes para a melhor compreensão das respostas clínicas e fisiopatológicas da DAP.

Sabe-se que a serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) desempenha funções biológicas importantes no sistema cardiovascular, incluindo agregação plaquetária, bradicardia ou taquicardia, hipotensão ou hipertensão e vasodilatação ou vasoconstrição^{6,7}. A diversidade das ações funcionais da 5-HT relaciona-se ao número de subtipos de receptores, bem como à complexidade da via de sinalização envolvida nas respostas. A esse respeito, pelo menos 15 subtipos de receptores 5-HT têm sido caracterizados, sendo subdivididos em sete famílias de receptores, de acordo com as propriedades farmacológicas, as sequências de aminoácidos, a organização dos genes e as vias de acoplamento de segundo mensageiro^{8,9}. As famílias de receptores 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇ são acopladas a G-proteínas, enquanto os receptores 5-HT₃ são canais iônicos associados à 5-HT. Entre os receptores 5-HT, os subtipos 5-HT₁ e 5-HT₂ desempenham um papel importante na regulação do sistema cardiovascular, em que a família do receptor 5-HT₁ está ligada principalmente à proteína G inibitória (Gi/o), que impede a formação da adenosina monofosfato cíclico (AMPc), enquanto a família de receptores 5-HT₂ é acoplada preferencialmente a proteínas Gq/11, levando à ativação da via de sinalização IP3/PKC/citosólica [Ca²⁺]¹⁰. Tanto a família de receptor 5-HT₁ quanto a de 5-HT₂ associam-se à contração do músculo liso vascular e à formação de trombo^{9,11}.

A ativação dos receptores α - e β -adrenérgicos por catecolaminas também produz uma série de respostas funcionais no sistema cardiovascular, incluindo respostas cronotrópicas positivas e controle do tônus vascular^{12,13}. A vasoconstrição mediada pelo receptor α -adrenérgico tem sido amplamente estudada em condições normais e patológicas¹⁴⁻¹⁶, mas poucos estudos avaliam a vasodilatação mediada pelos receptores β -adrenérgicos^{17,18}. A esse respeito, pelo menos três subtipos de receptores β -adrenérgicos medeiam as respostas de relaxamento em tecidos vasculares e acoplam-se à proteína Gs, levando à ativação da via de sinalização da proteína quinase (PK) dependente de AMPc¹⁹.

As vias de sinalização dos receptores serotoninérgicos ou adrenérgicos são alvos para o tratamento das doenças

cardiovasculares, incluindo insuficiência cardíaca, hipertensão arterial, doença coronariana e DAP^{4,20}. Assim, os estudos farmacológicos sobre pequenas artérias e as interações entre as drogas, envolvendo as vias de sinalização dos receptores serotoninérgicos e adrenérgicos, são cruciais para o desenvolvimento de novos compostos em uma tentativa de melhorar a qualidade de vida de pacientes com doenças vasculares. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades farmacológicas dos agentes contráteis (5-HT e fenilefrina) e relaxantes (isoproterenol e forskolina) no segmento proximal da artéria femoral de ratos.

Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Campinas (UNICAMP), sob o protocolo nº 1307-1.

Animais

Ratos Wistar machos (407, 6g) foram alojados individualmente em 26 ± 2 °C, com alimentos e água *ad libitum* e em 12h de luz (ciclo escuro e as luzes acesas às 6h). Além disso, foram submetidos à inalação de CO₂, sacrificados por decapitação e sangrados.

Anéis isolados da artéria femoral de ratos

A artéria femoral foi rapidamente removida e colocada em solução tampão de Krebs-Henseleit, refrigerada com a seguinte composição (mM): NaCl 118, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄.7H₂O 1.17, CaCl₂.2H₂O 2.5, NaHCO₃ 25 e glucose 5.6. O segmento proximal da artéria femoral foi isolado, e dois anéis (de aproximadamente 2 mm de comprimento) foram retirados e montados em uma câmara de órgãos de 5 ml. Um miógrafo para gravação de força isométrica (Danish Myo Technology, modelo 610m, Aarhus N, Dinamarca) foi acoplado a um sistema de aquisição, com *software* específico (PowerLab 30/08, LabChart 7, ADInstruments, Sydney-NSW, Austrália). A solução de banho foi mantida a 37°C e continuamente gaseificada com 95%-O₂ e 5%-CO₂, com pH de 7,4. Os tecidos foram estabilizados por 60 minutos, sob uma tensão de repouso de 1 mN²¹.

Curvas concentração-resposta aos agentes contráteis

Após o período de equilíbrio, os anéis foram contraídos com KCl 80 mM, para verificar a viabilidade do tecido, e foram lavados com Krebs. Além disso, foram contraídos com fenilefrina (FE, 1 mM) e relaxados com acetilcolina (ACH, 1 μ M), de modo a confirmar a integridade do endotélio. Os anéis sem respostas contráteis ou relaxantes foram eliminados.

A fim de avaliar as respostas contráteis mediadas por receptores serotoninérgicos e α -adrenérgicos, curvas cumulativas concentração-resposta à 5-hidroxitriptamina (5-HT: 1 nM - 100 mM) e à fenilefrina (FE: 1 nM - 100 mM) foram construídas no segmento proximal dos anéis da artéria femoral²².

As curvas concentração-resposta ao isoproterenol (1 nM - 10 mM) foram obtidas em tecidos contraídos com FE (1 mM) ou com 5-HT (10 mM), para analisar a interação entre a ativação dos receptores β -adrenérgicos e a dos receptores

α -adrenérgicos ou serotoninérgicos. Também realizamos curvas concentração-resposta para o ativador adenilato ciclase e a forskolina (1 nM - 100 μ M) em anéis femorais, com fins de determinar se as interações medicamentosas podem acontecer em nível do receptor ou em níveis superiores.

Todos os dados de concentração-resposta foram avaliados a fim de ajustá-los em uma função logística na fórmula: $E = E_{max} / ((1 + (10^x/10^{EC_{50}})^n) + \Phi)$, em que E é o efeito do basal acima; E_{max} é a resposta máxima produzida pelo agonista; c é o logaritmo da EC_{50} , concentração do agonista que produz metade do máximo de resposta; x é o logaritmo da concentração do agonista; n é um parâmetro de ajuste de curvas que define a inclinação da linha de resposta de concentração; e Φ é a resposta observada na ausência do agonista acrescentado. A análise de regressão não linear foi utilizada para determinar os parâmetros E_{max} e $\log EC_{50}$, utilizando GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA), com a restrição de que $\Phi = 0$. As respostas para cada agonista são demonstradas como a média \pm EPM de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}). Os relaxamentos foram plotados como porcentagens das contrações induzidas pela FE ou 5-HT, e as respostas contráteis foram plotadas como porcentagem da concentração induzida por KCl (80 mM).

Análise estatística

Os dados são expressos como média \pm EPM de experimentos n. O teste t de Student pareado ou não pareado foi realizado por meio de software específico (InStat, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Os valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Fármacos

Cloreto de acetilcolina, hidrocloreto de fenilefrina, 5-hidroxitriptamina, forskolina e isoproterenol foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA).

Resultados

Respostas contráteis

Tanto a 5-HT quanto a FE produziram respostas contráteis dependentes da concentração em anéis de artéria femoral (Figura 1A). A potência da 5-HT foi significativamente maior em comparação à FE agonista- α 1 (cerca de 20 vezes) no segmento proximal da artéria femoral de ratos. Não foram encontradas diferenças nas respostas máximas para ambos os agonistas. Esses dados estão resumidos na Tabela 1.

Respostas de relaxamento

Em outro conjunto de experimentos, avaliamos as respostas de relaxamento para o isoproterenol agonista β -adrenérgico, em que os anéis da artéria femoral foram contraídos com FE (10 μ M) ou 5-HT (1 μ M). Em anéis contraídos com FE, o isoproterenol produziu respostas de relaxamento dependentes da concentração. No entanto, em anéis contraídos com 5-HT, o isoproterenol evocou uma resposta de relaxamento inferior em anéis de artéria femoral em relação aos anéis pareados contraídos com FE (Figura 1B). Para testar a hipótese de que tecidos contraídos com 5-HT afetavam o nível dos receptores β -adrenérgicos ou os níveis superiores (via de sinalização), curvas de concentração-resposta para o ativador da adenilil ciclase forskolina foram obtidas em anéis de artéria femoral contraídos com FE (10 μ M) ou 5-HT (1 μ M). Em anéis contraídos com FE, a forskolina produziu respostas de relaxamento dependentes da concentração. Todavia, um deslocamento paralelo dextral, de cerca de nove vezes, foi observado nas curvas de concentração-resposta para forskolina em tecidos contraídos com 5-HT, em comparação aos anéis pareados da artéria femoral contraídos com FE (Figura 1C). Não foram encontradas diferenças nas respostas máximas para o ativador da adenilil ciclase em contração com dois agentes. Esses dados estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de potência (pEC_{50}) e respostas máximas (E_{max}) obtidas a partir de curvas concentração-resposta à fenilefrina (FE), à 5-hidroxitriptamina (5-HT), ao isoproterenol (ISO) e à forskolina em anéis da artéria femoral de ratos contraídos com FE ou 5-HT

	pEC_{50}	E_{max}
Respostas contráteis		
FE	5,50 \pm 0,04 (10)	114 \pm 2
5-HT	6,86 \pm 0,01 (8)*	119 \pm 2
Respostas de relaxamento		
ISO (contração com FE)	5,33 \pm 0,08 (6)	95 \pm 2
ISO (contração com 5-HT)	ND (4)	10 \pm 1 [†]
Forskolina (contração com FE)	6,70 \pm 0,06 (4)	102 \pm 1
Forskolina (contração com 5-HT)	5,74 \pm 0,07(5) [‡]	96 \pm 1

A potência é representada como $-\log$ da concentração molar para produzir 50% da resposta máxima. Os dados representam a média \pm SEM de 4-10 experimentos. ND - não determinado. O número de experimentos é mostrado entre parênteses. * $p < 0,05$ em comparação às respostas contráteis da FE. [†] $p < 0,05$ em comparação ao relaxamento ISO em tecidos contraídos com FE. [‡] $p < 0,05$ em comparação ao relaxamento da forskolina em tecidos contraídos com FE.

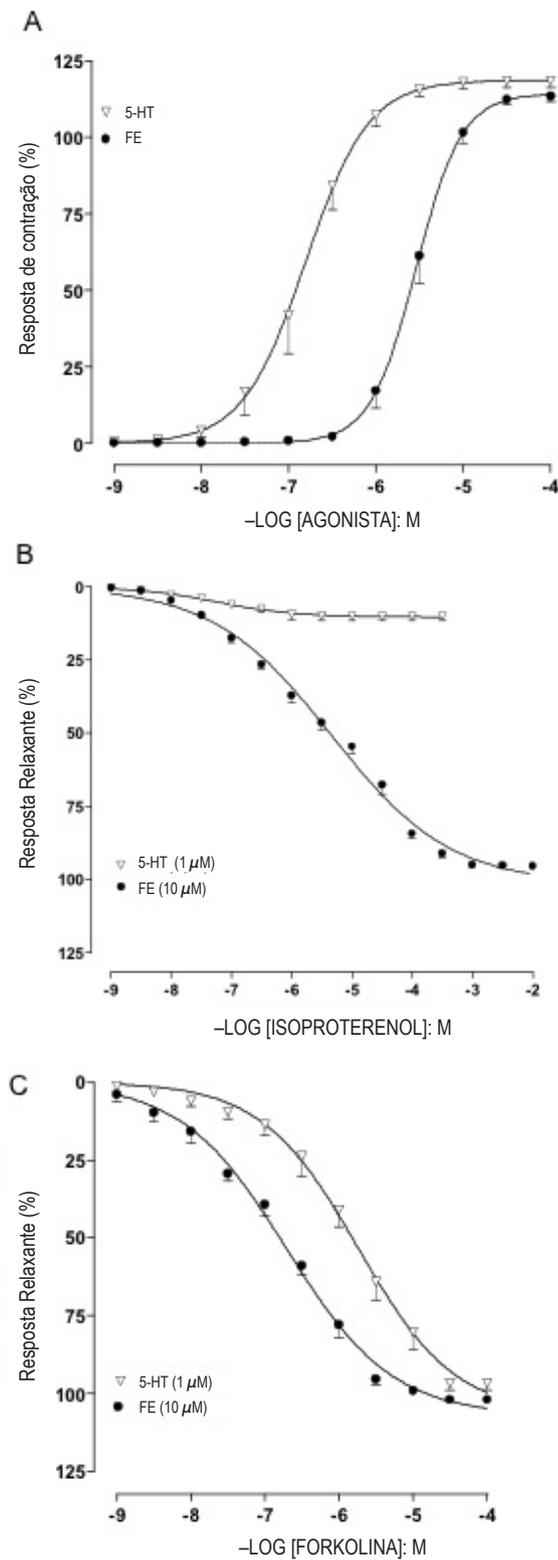


Fig. 1 - Curvas concentração-resposta à fenilefrina (•FE, n = 10) e à 5-hidroxitriptamina (▽5-HT, n = 08) na artéria femoral de ratos (painel A). Relaxamento induzido pelo isoproterenol contraído com FE (10 μM, n = 06, •) ou 5-HT (1 μM; N = 4, ▽) na artéria femoral de ratos (painel B). Relaxamento induzido pela forskolina contraída com FE (10 μM, n = 04, •) ou 5-HT (1 μM; n = 5, ▽) na artéria femoral de ratos (painel C). Os dados são médias ± SEM.

Discussão

Neste estudo, observou-se que a potência de ordem de classificação no segmento proximal da artéria femoral foi de 5-HT > FE, para as respostas contráteis que podem refletir maior densidade de receptores serotoninérgicos ou elevada eficácia do mecanismo de via de sinalização nessa preparação, em contraste com a via a jusante de receptores α -adrenérgicos/AMPC/PK. Curiosamente, um estudo anterior encontrou potência de classificação semelhante para a 5-HT em diferentes anéis arteriais, incluindo os anéis mesentéricos, caudais e basilares²³. Além disso, a potência de 5-HT encontrada em nosso estudo para o segmento proximal na artéria femoral (6,86) mostrou-se intimamente relacionada aos resultados obtidos na artéria basilar (6,88), indicando que ambas as preparações apresentam grandes semelhanças nas propriedades farmacológicas. Além disso, evidências clínicas mostram que a DAP é mais comum em pacientes com enxaqueca do que em pacientes não acometidos pela cefaleia^{24,25}. Ao todo, nossos dados mostram que a artéria femoral é um interessante modelo para o estudo das vias de sinalização dos receptores serotoninérgicos em condições normais e patológicas, como diabete melito e aterosclerose.

Neste estudo, também descobrimos que os tecidos contraídos com 5-HT praticamente aboliram a resposta de relaxamento para o isoproterenol (10% de respostas máximas), tendo sido parcialmente restaurados pela forskolina, um estimulante de ação direta da guanilato ciclase que ignora β -adrenérgicos. Portanto, nossos resultados mostram uma interação entre as vias de sinalização dos receptores β -adrenérgicos e serotoninérgicos na artéria femoral. A esse respeito, um estudo anterior demonstrou uma interação entre o receptor β -adrenérgico e a 5-HT₁ na liberação de glutamato nos terminais do nervo cerebrocortical²⁶. Assim, nossos dados reforçam que o segmento proximal da artéria femoral é um tecido vascular interessante para estudar os receptores de 5-HT e a complexa via de sinalização. No entanto, não podemos determinar, a partir deste estudo, que o subtipo de receptor 5-HT medeia a resposta contrátil ou os efeitos de transdução que contribuem para a supressão do relaxamento de mediação do receptor β -adrenérgico na

artéria femoral de ratos. Evidências indicam que a família de receptores 5-HT₁ é fundamentalmente ligada à Gi/o, proteína sensível à toxina pertússis negativamente associada à adenilil ciclase⁹. Por outro lado, a ativação do receptor β -adrenérgico é acoplada à proteína Gs, que, por sua vez, leva à ativação da via de sinalização AMPC/PK no sistema cardiovascular¹⁹. Assim, a interação antagonica entre os receptores 5-HT e β -adrenérgicos pode ocorrer no receptor acoplado à proteína G, bem como no nível dos substratos de PK, tendo em vista que a forskolina restaurou parcialmente a supressão do relaxamento de mediação do receptor β -adrenérgico em anéis da artéria femoral de ratos contraídos com 5-HT. O significado funcional desses dados pode estar relacionado à incidência de doença vascular e à administração de agonistas de 5-HT/bloqueadores de captação de 5-HT em algumas doenças como enxaqueca e obesidade.

Conclusão

Em conclusão, nossos dados mostraram claramente que ocorre uma interação entre as vias de sinalização dos receptores β -adrenérgicos e serotoninérgicos em anéis da artéria femoral de ratos. Além disso, este estudo fornece uma perspectiva interessante para o estudo das vias de sinalização dos receptores serotoninérgicos em condições normais e patológicas, em uma tentativa de melhorar os resultados clínicos em pacientes com DAP.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESP.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Alexandre Sérgio Silva pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho e Universidade Estadual de Campinas.

Referências

1. Mewissen MW. Stenting in the femoropopliteal arterial segment. *Tech Vasc Interv Radiol*. 2005;8(4):146-9.
2. Schainfeld 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 transcutaneous 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, Eglén 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, Komiya T. Functions of 5-HT_{2A} 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-8S.
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 JJ, 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.