

EFFECTOS DE LA INSULINA SOBRE LA RESPUESTA CONTRACTIL Y LA CAPTACION DE CALCIO EN AORTA DE RATA

ALEJANDRO REBOLLEDO, VERONICA MILESI, GUSTAVO RINALDI, ANGELA GRASSI

Cátedras de Anatomía y Fisiología y de Fisiología Humana, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata

Resumen La insulina afecta mecanismos fisiológicos generales que regulan la presión arterial, y a nivel celular modifica las funciones del endotelio y del músculo liso vascular, que son determinantes de la resistencia periférica. Describimos los efectos de la preincubación con insulina (40 μ U/ml, durante 1-2 hs) sobre la reactividad contráctil de anillos intactos de aorta de rata y sobre la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en segmentos de aorta de rata hiperpermeabilizados por tratamiento con EGTA. La preincubación con insulina no afectó las contracciones inducidas por 1 μ M de NA, ni la relajación de las mismas inducida por 10 mM de caféina. La respuesta contráctil a 1 μ M de Ang-II (que en la aorta de rata es independiente de endotelio) fue estimulada por la preincubación con insulina en la fuerza máxima desarrollada y en la velocidad de relajación espontánea de la contracción. La diferencia en la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en RS entre los segmentos de aorta tratados y no tratados con insulina fue mayor a los 5 minutos con respecto a la medida a los 30 minutos. Se concluye que la preincubación con insulina afecta en forma directa la respuesta mecánica del músculo liso aórtico estimulado con Ang-II y se propone a la modificación de la actividad del RS como uno de los mecanismos mediante el cual la insulina participa en la regulación del Ca^{2+} citosólico.

Palabras clave: aorta, insulina, angiotensina II, noradrenalina, retículo sarcoplásmico, captación de Ca^{2+}

La asociación de hiperinsulinemia y/o resistencia insulínica con hipertensión arterial ha originado numerosos estudios sobre la participación de la insulina en la regulación del tono vascular. La insulina afecta mecanismos que disminuyen directa o indirectamente la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). En sarcolema estimula la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}^{1-3}$, y el mayor gradiente extra/intracelular de Na^+ y la hiperpolarización resultantes de este efecto, pueden respectivamente activar el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e inhibir el influjo de Ca^{2+} por canales voltaje operados (VOC). Otro efecto es el de aumentar la

expresión de la $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$ del retículo sarcoplásmico⁴ lo cual mejoraría la capacidad de este depósito para acumular Ca^{2+} . La modificación de estos mecanismos por la insulina tendrían como correlato mecánico la relajación del músculo liso vascular. Estudios 'in vivo' apoyan esta hipótesis ya que la insulina produce vasodilatación del lecho vascular del antebrazo que depende sólo parcialmente de la liberación de óxido nítrico por el endotelio⁵. Los resultados con preparaciones 'in vitro' también muestran que los aumentos transitorios de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por agonistas presores son atenuados por la preincubación de las células de músculo liso vascular con insulina. Este efecto sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular se ha demostrado para angiotensina II (Ang II), noradrenalina (NA) y arginina vasopresina (AVP) en arteria mesentérica de rata⁶, para serotonina

Recibido: 19-III-1996

Aceptado: 16-VIII-1996

Dirección postal: Dra. Angela O. Grassi, C.C. 219, Correo Central, 1900 La Plata, Argentina

en arteria femoral canina⁷ y para AVP en aorta de rata y arteria pulmonar humana⁸. En este último estudio también se demostró que la preincubación con insulina estimulaba la velocidad de recuperación de la $[Ca^{2+}]_i$ a niveles de reposo en contracciones inducidas por Ang II y por AVP. La aceleración de la remoción del calcio citosólico siguiendo a la estimulación se relacionó con la capacidad de la insulina para aumentar la expresión del ARNm de las Ca^{2+} -ATPasas de membrana y de retículo sarcoplásmico⁴.

Las atenuaciones de los aumentos transitorios del calcio intracelular producidas por la insulina, cuyo correlato mecánico debe ser una menor contracción vascular, son independientes del endotelio ya que se han descrito en células de músculo liso vascular aisladas y/o en cultivo. En la rata se ha encontrado que la relajación vascular inducida por la insulina tampoco depende del endotelio⁹. Se ha descrito que la insulina aumenta la síntesis y secreción de endotelina en células endoteliales y el número de receptores a endotelina en músculo liso vascular¹⁰. De manera que la respuesta mecánica de anillos de aorta expuestos a insulina puede estar condicionada tanto por sus efectos relajantes actuando sobre el músculo liso vascular como por sus efectos contrayentes actuando sobre el endotelio y sobre el músculo liso vascular. Es posible postular que la exposición de los vasos a la insulina incrementa la actividad de mecanismos relacionados con la relajación vascular y que la falta de este estímulo debido al estado de resistencia insulínica sea una de las causas para que se produzca la asociación entre resistencia insulínica e hipertensión arterial.

El objetivo de este trabajo fue determinar si la preincubación con insulina facilita el mecanismo de relajación en anillos de aorta intactos contraídos por agonistas fisiológicos, y si este efecto se correlaciona con la activación del transporte de Ca^{2+} en depósitos intracelulares. Se estudió si la preincubación con insulina afectaba:

1. la respuesta mecánica de anillos de aorta con endotelio intacto estimulados con Ang II y NA en ausencia de insulina.

2. la captación de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico de segmentos de aorta hiperpermeabilizados por tratamiento químico.

Material y métodos

Determinaciones mecánicas

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar, de 250-300 g de peso a las que se les extrajo la aorta bajo anestesia con éter etílico. Luego de separar el tejido conectivo se cortaron de la porción torácica de la aorta anillos de alrededor de 2 mm; los anillos fueron conectados en forma isométrica a un transductor de fuerza (Letica TRI 201) y sumergidos en una cámara plástica conteniendo solución de Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB) equilibrada con 5% de CO_2 y 95% de O_2 y termostalizada a 37° C. La solución contenía en mM: ClNa 130, ClK 4,7, CO_3HNa 24, PO_4HNa_2 1,17, SO_4Mg 1,16, Cl_2Ca 1,6 y glucosa 11. La señal del transductor fue ingresada a una plaqueta adquisidora y convertora analógico/digital (Data Translation inc. modelo DT-01-EZ) a una frecuencia de 27 Hz y almacenada en computadora para obtener valores y registros gráficos de fuerza desarrollada en función del tiempo. Se impuso una tensión de reposo de 3 g que se ajustó durante el período de estabilización de 1 hora con cambios de la solución cada 20 minutos. Se realizaron 4 protocolos experimentales:

1. *Grupo control para la estimulación con Ang-II:*
 - a. contracción por adición de 1 μM de Ang-II. (Contracción transitoria con relajación espontánea)
 - b. lavado de la Ang-II
 - c. incubación durante una hora con KRB control
 - d. segunda contracción por adición de 1 μM de Ang-II
2. *Grupo incubado con insulina para la estimulación con Ang-II:*

Se siguió la misma secuencia que en el protocolo 3) y durante la hora de incubación (paso c) se le agregó al KRB 40 $\mu U/ml$ de insulina de tipo corriente y origen bovino. El paso d, se realizó en ausencia de insulina.

 3. *Grupo control para la estimulación con NA:*
 - a. contracción por adición de 1 μM de NA
 - b. adición de 10 mM de cafeína para provocar una relajación rápida similar a la obtenida con Ang-II.
 - c. incubación durante 1 hora con KRB control
 - d. segunda contracción por adición de 1 μM de NA
 - e. adición de 10 mM de cafeína para provocar relajación
 4. *Grupo incubado con insulina para la estimulación con NA:*

Se siguió la misma secuencia que en el protocolo 1) y durante la hora de incubación (paso c) se le agregó al KRB 40 $\mu U/ml$ de insulina de tipo corriente y origen bovino. Los pasos d. y e. se realizaron en ausencia de insulina.

Los parámetros medidos en los registros fueron: fuerza máxima desarrollada en gramos (F), tiempo necesario para que se relaje la mitad de F en seg ($t_{1/2}$), y velocidad media de relajación hasta la mitad de F en mg/seg (V). Los resultados se presentan como valores medidos en la estimulación previa y en la posterior a la incubación. La comparación se realizó entre promedios de diferencias de los parámetros medidos en las dos estimulaciones (pre y post incubación) para los grupos no tratados y tratados con insulina.

Determinaciones de captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en segmentos de aorta tratados con EGTA

La aorta fue obtenida como se describió previamente y cortada en segmentos cuyo peso promedio fue de $12,1 \pm 0,25$ mg ($n = 208$). Luego de colgar los segmentos en alambres de acero inoxidable (0,2 mm), se agruparon por pares (2 por cada aorta) y se incubaron durante dos horas a 37°C ; M de cada par, uno de los segmentos se incubó en KRB control y el otro en KRB con $40 \mu\text{U/ml}$ de insulina. Terminada la incubación se sumergieron durante 24 hs a 4°C en una solución conteniendo en mM: EGTA 5, propionato de K 50, Hepes (pH 7) 20, ditiotreitól 1, Cl_2Mg 0,4 y sacarosa 150. Este tratamiento permeabiliza la membrana plasmática y permite que las organelas intracelulares estén en contacto con las soluciones de captación conteniendo $^{45}\text{Ca}^{2+}$ y con las soluciones de lavado¹¹. Luego del 'pelado' químico los segmentos fueron usados para medir captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en retículo sarcoplásmico (RS) en función del tiempo. Pares de segmentos incubados previamente uno sin y otro con insulina, se sumergieron en una solución mantenida a 20°C conteniendo en mM: EGTA 0,71, ^{45}Ca -EGTA 0,29 ($0,5 \mu\text{M}$ de calcio libre¹²), propionato de K 100, Hepes (pH 7) 20, ditiotreitól 1, Cl_2Mg 5,76 (1 mM libre¹²), ATPN_2 0,57 ($0,5 \mu\text{M}$ libre¹²) y sacarosa 150. Los tiempos de captación fueron de 2, 5, 10 y 30 minutos, al cabo de los cuales los segmentos fueron lavados durante 15 minutos en una solución mantenida a $4-6^\circ\text{C}$ conteniendo en mM: EGTA 1, propionato de K 100, Hepes (pH 7) 20, Cl_2Mg 10, ATPN_2 5 y rojo de rutenio 0,05. Luego se sumergió

cada segmento en 1 ml de EDTA 1 mM (pH 7) durante 1 hora. Se midió la radioactividad remanente en el tejido en contador de centelleo líquido. La captación de calcio se expresa en pmoles por mg de tejido húmedo.

Se compararon diferencias de captación en cada par de segmentos de aorta incubados previamente uno sin y otro con insulina.

Los resultados se muestran como promedios ± 1 error estándar. Se usó el test de «t» de Student para muestras apareadas aceptándose un valor de $p < 0,05$ para la significación estadística. Las drogas usadas fueron de grado analítico; Ang-II, cafeína y NA se obtuvieron de Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri, la insulina se obtuvo de Laboratorios Beta.

Resultados

Registros típicos de contracciones inducidas por $1 \mu\text{M}$ de NA antes y después de la incubación sin insulina o con insulina se muestran en la Figura 1. La Tabla 1 muestra los valores para los pará-

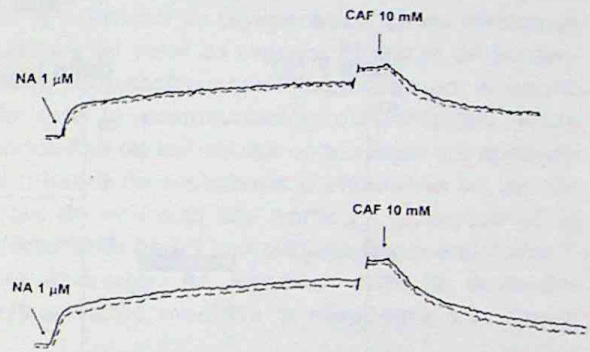


Fig. 1.— Registros típicos de contracciones inducidas por noradrenalina $1 \mu\text{M}$ que se relajan por el agregado de cafeína 10 mM . Panel superior: experimento control: primera contracción (—) y segunda contracción post-incubación con KRB sin insulina (- - -) Panel inferior: experimento con insulina: primera contracción (—) y segunda contracción post-incubación con KRB con $40 \mu\text{U/ml}$ de insulina (- - -).

TABLA I.— Valores de fuerza máxima desarrollada (F), tiempo necesario para relajar la mitad de F ($t_{1/2}$) y velocidad media de relajación hasta la mitad de F (V) de las contracciones inducidas por NA $1 \mu\text{M}$

	F (g)	$t_{1/2}$ (seg)	V (mg/seg)
NA control (n = 6)			
preincubación	$1,02 \pm 0,08$	80 ± 3	$6,47 \pm 0,65$
postincubación sin insulina	$1,02 \pm ,09$	65 ± 13	$8,51 \pm 1,04$
NA-insulina (n = 10)			
preincubación	$1,06 \pm 0,07$	80 ± 8	$7,11 \pm 0,72$
postincubación con insulina	$1,01 \pm 0,08$	$57 \pm 4^*$	$9,15 \pm 0,81$

* $P < 0,05$

metros determinados en los grupos estimulados con NA, control y preincubado con insulina. La incubación no cambió la fuerza máxima inducida por NA en el grupo control ni en el tratado con insulina. La incubación tiende a disminuir el $t_{1/2}$ y a aumentar la velocidad de relajación tanto en el grupo control como en el incubado con insulina alcanzando significación estadística sólo para el $t_{1/2}$ en el grupo incubado con insulina. Las diferencias entre pre y post incubación no fueron significativas entre el grupo control y el tratado con insulina (Figura 2).

Los resultados obtenidos con dos estimulaciones sucesivas de Ang-II separadas por un período de incubación sin y con insulina se muestran en la Figura 3 y en la tabla II. Cuando se estimuló dos veces consecutivas con Ang-II, se

paradas por una hora de incubación, se produjo en el grupo control una caída en F de la segunda contracción con respecto a la primera como manifestación de la taquifilaxia a la droga (Fig. 3, panel superior). En el grupo incubado con insulina no hubo cambios de F en la segunda contracción con respecto a la primera (Fig. 3, panel inferior). El efecto más notable de la insulina sobre las contracciones inducidas por Ang-II fue sobre la velocidad de relajación que aumentó $0,43 \pm 0,16$ mg/seg en la segunda contracción con respecto a la primera, mientras que en el grupo control disminuyó en $0,63 \pm 0,18$ mg/seg ($P < 0,005$ comparando diferencias entre control e incubado con insulina). El $t_{1/2}$ no cambió significativamente por la incubación con insulina con respecto al grupo control (Figura 4).

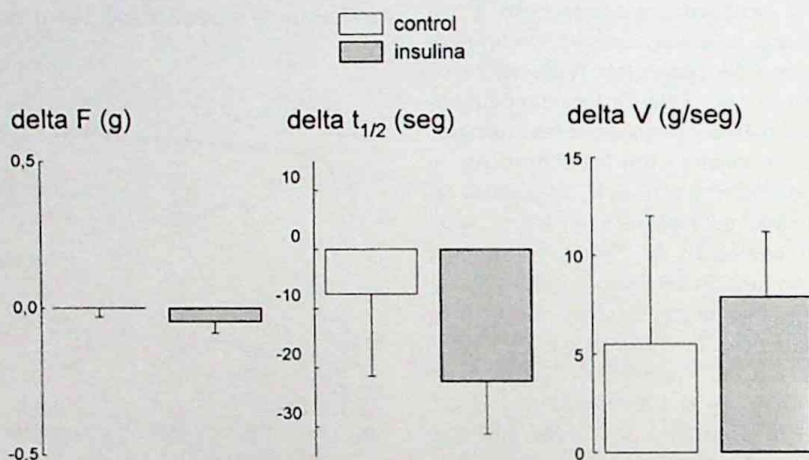


Fig. 2.— Efectos de la preincubación con insulina sobre las diferencias medidas (delta = post-incubación - preincubación) en las contracciones inducidas por noradrenalina $1 \mu\text{M}$. F = fuerza máxima desarrollada, $t_{1/2}$ = tiempo necesario para que se relaje la mitad de F, v = velocidad media de relajación hasta la mitad de F.

TABLA II.— Valores de fuerza máxima desarrollada (F), tiempo necesario para relajar la mitad de F ($t_{1/2}$) y velocidad media de relajación hasta la mitad de F (V) de las contracciones inducidas por Ang-II $1 \mu\text{M}$.

	F (g)	$t_{1/2}$ (seg)	V (mg/seg)
Ang-II-control (n = 5)			
preincubación	$0,48 \pm 0,04$	164 ± 56	$1,66 \pm 0,32$
postincubación sin insulina	$0,18 \pm 0,01^*$	101 ± 28	$1,04 \pm 0,16$
Ang-II-insulina (n = 5)			
preincubación	$0,40 \pm 0,04$	144 ± 28	$1,62 \pm 0,29$
postincubación con insulina	$0,34 \pm 0,03$	95 ± 18	$2,05 \pm 0,39$

* $P < 0,05$

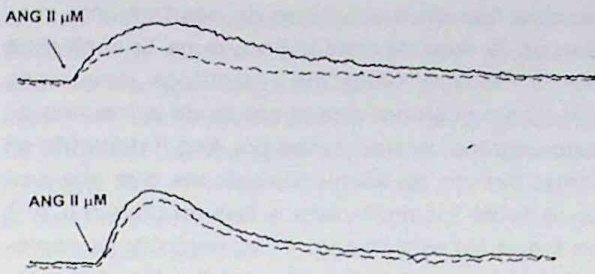


Fig. 3.— Registros típicos de contracciones inducidas por angiotensina II 1 μ M. Panel superior: experimento control: primera contracción (-) y segunda contracción post-incubación con KRB sin insulina (- -). Panel inferior: experimento con insulina: primera contracción (-) y segunda contracción post-incubación con KRB con 40 μ U/ml de insulina (- -)

La Figura 5 muestra los resultados obtenidos en la captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ medida en segmentos de aorta hiperpermeabilizados; la captación en los segmentos preincubados con insulina durante 2 horas no fue significativamente diferente de la medida en los segmentos preincubados por igual tiempo sin insulina. Las diferencias en la capta-

ción entre pares de segmentos se muestran en el panel inferior; en los segmentos incubados con insulina la captación a los 5 minutos tiende a ser más elevada pero es deprimida a tiempos mayores. La insulina produce diferencias en la captación con significación estadística si se comparan los tiempos de 5 y 30 minutos.

Discusión

La preincubación con insulina de segmentos de aorta de rata produce un aumento en la fuerza desarrollada y en la velocidad de relajación de las contracciones inducidas por Ang-II. Según hallazgos previos⁸, estos resultados podrían explicarse porque la elevación transitoria del Ca^{2+} intracelular inducida por Ang-II está modificada por la preincubación con insulina durante un tiempo similar al usado en el presente estudio en dos aspectos: aumento del pico de calcio y aumento de la velocidad de recuperación de los niveles de calcio a su valor de reposo. El efecto de aumentar la contracción podría explicarse por el hecho de que la preincubación con insulina libera endotelina de las células endoteliales y/o aumenta el número de receptores a endotelina en las células de músculo liso aórtico¹⁰, potenciando el efecto de la Ang-II que también libera endotelina¹³. Sin embargo, en aorta de rata la desendotelización no modifica la respuesta a la Ang-II

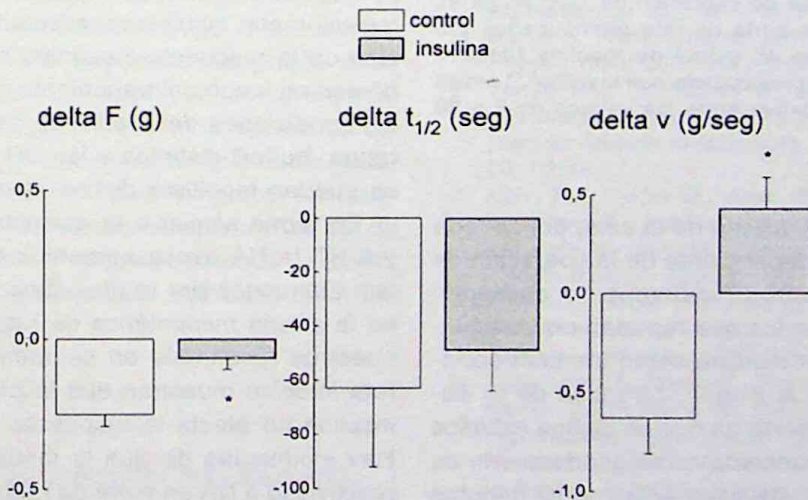


Fig. 4.— Efectos de la preincubación con insulina sobre las diferencias medidas (delta = post-incubación - preincubación) en las contracciones inducidas por angiotensina II 1 μ M. F = fuerza máxima desarrollada, $t_{1/2}$ = tiempo necesario para que se relaje la mitad de F, v = velocidad media de relajación hasta la mitad de F.

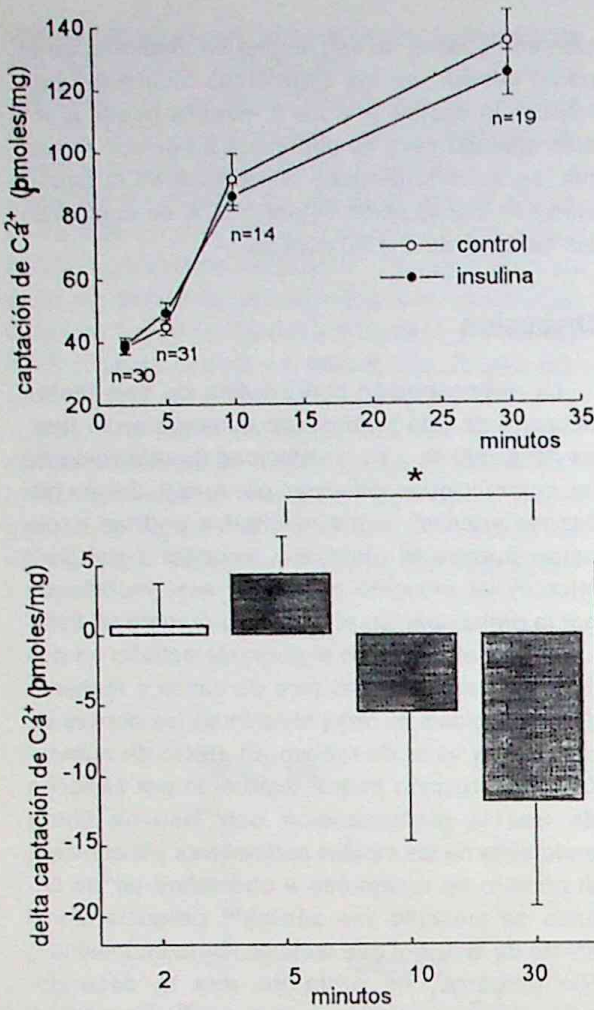


Fig. 5.— Panel superior: curva de captación de Ca²⁺ en segmentos de aorta de rata preincubados (-●-) y no preincubados (-○-) con 40 μU/ml de insulina. Panel inferior: diferencias de captación de Ca²⁺ en pares de segmentos de aorta de rata preincubados y o preincubados con 40 μU/ml de insulina (delta = preincubado - no preincubado con insulina). * indica diferencia significativa entre los valores de 5 y 30 minutos.

como lo hace en la arteria de la cola, donde toda la contracción es dependiente de la liberación de endotelina¹³. Nuestros resultados no coinciden aparentemente con los que reportan una atenuación producida por insulina sobre las contracciones inducidas por la Ang-II⁷. La razón de la discrepancia puede residir en que en dichos estudios la contracción fue medida como acortamiento de las fibras musculares lisas antes y 10 minutos después de estimularlas con el agonista, y en nuestros registros la contracción alcanza su valor máximo dentro de los 5 minutos de iniciada

la estimulación y se relaja en forma inmediata; de manera que las mediciones de acortamiento caerían en la fase de relajación que es la acelerada por la insulina. Nuestros resultados mecánicos orientan a sostener que el efecto de la insulina de potenciar las contracciones por Ang-II depende en forma directa de las modificaciones que ella produce sobre los mecanismos que regulan la [Ca²⁺]_i en los miocitos aórticos. El aumento de la expresión de la bomba de calcio del retículo sarcoplásmico⁴ puede explicar aumentos simultáneos en la fuerza pico y en la velocidad de relajación. Una mayor densidad de la bomba en las membranas reticulares puede permitir un mayor nivel de calcio acumulado en estado estacionario para ser liberado por estímulos que movilizan el Ca²⁺ de depósitos intracelulares (aumento de la fuerza pico) y también incrementar la velocidad de la retoma de calcio (aumento de la velocidad de relajación). Nuestros resultados sobre captación de Ca²⁺ en segmentos de aorta hiperpermeabilizados muestran que la preincubación con insulina tiende a aumentar el calcio acumulado a tiempos cortos (5 minutos) y a deprimirlo cuando la captación tiende a ser máxima (30 minutos). Una posible explicación de estos efectos es que la insulina afecte no sólo a la actividad de la Ca²⁺-ATPasa sino también al eflujo de Ca²⁺ del RS que durante el período de captación no está inhibido. La demostración de que el eflujo de Ca²⁺ en el RS aumenta por la preincubación con insulina permitiría sostener esta hipótesis. No podemos descartar que los efectos de la preincubación con insulina manifestados como alteración de la respuesta mecánica a Ang-II no sean diferentes luego del tratamiento con EGTA ni que las condiciones del medio de captación (temperatura, buffer) distintas a las del ensayo mecánico puedan modificar dichos efectos.

En forma similar a la estimulación con Ang-II y 5-HT la NA evoca aumentos de la [Ca²⁺]_i que son atenuados por la preincubación con insulina en la arteria mesentérica de rata¹⁴. Sin embargo nuestros resultados en segmentos de aorta de rata intactos muestran que la preincubación con insulina no afecta la respuesta mecánica a NA. Hay evidencias de que la insulina no afecta la reactividad a NA en aorta de ratas insulinopénicas (ratas diabéticas por tratamiento con estreptozotocina)¹⁵⁻¹⁷. Por otra parte, en aortas de ratas diabéticas espontáneas y por administración de

estreptozotocina se ha detectado un aumento de la respuesta rápida a NA (dependiente de la liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares), que se corrige después del tratamiento con insulina¹⁸. En nuestros experimentos la velocidad de relajación inducida por la cafeína sobre la contracción por NA fue modificada por la preincubación con insulina con respecto al control, posiblemente porque los mecanismos puestos en juego por la cafeína para relajar estén activados en forma máxima con 10 mM de cafeína y/o no sean afectados por la preincubación con insulina.

La asociación entre resistencia insulínica y/o hiperinsulinemia e hipertensión arterial está avalada por estudios epidemiológicos^{9, 18}. Para explicar esta asociación se proponen efectos de la insulina que son primariamente extravasculares, como la estimulación del sistema nervioso simpático y la retención renal de sodio, y efectos directos de la insulina sobre los vasos^{5, 9}. Sin embargo estos últimos son complejos e incluyen modificaciones de procesos celulares que tanto pueden aumentar como disminuir el tono vascular, de manera que el nexo que relaciona los efectos vasculares de la insulina con la hipertensión arterial puede establecerse por dos vías diferentes: la resistencia insulínica suprime los efectos vasodilatadores de la insulina o los efectos vasoconstrictores de la insulina se manifiestan en mayor grado que los vasodilatadores ante una hiperinsulinemia. El presente trabajo demuestra que preincubar con insulina segmentos de aorta de ratas intactos condiciona al vaso para que se contraiga más y por menos tiempo al ser estimulado por Ang-II, una respuesta que puede estar relacionada con la modificación de la actividad del RS mediante la cual participa en la regulación del calcio citosólico. Si se demuestra que estos resultados son similares en vasos humanos, los niveles de insulina fisiológicos cumplirían un rol de modificar en forma directa mecanismos celulares que dan base a la respuesta mecánica del músculo liso vascular.

Summary

Effect of insulin on contractile response and calcium captation in rat aorta

Insulin affects physiological mechanisms involved in blood pressure regulation, and at the

cellular level modifies endothelial and vascular smooth muscle functions underlying the changes in peripheral resistance. We describe the effects of preincubation with insulin (40 $\mu\text{U/ml}$ for 1-2 hs) on the contractile reactivity of intact rat aortic rings and on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake of EGTA-hyperpermeabilized rat aortic segments. Preincubation with insulin did not affect either contractions induced by 1 μM of NA, or their relaxation induced by 10 mM of caffeine. The contractile response to 1 μM of Ang-II (which in rat aorta is endothelium-independent) was stimulated by insulin preincubation resulting in increases of both maximal developed force and velocity of its spontaneous relaxation. The difference in $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake between insulin-treated and insulin-untreated aortic segments was greater at 5 minutes than it was at 30 minutes. **Conclusions:** Insulin preincubation affects directly the mechanical response of Ang-II stimulated aortic smooth muscle; we suggest that the modification of SR function is one of the mechanisms involved in insulin regulation of cytosolic Ca^{2+} .

Bibliografía

1. Prakash TR, MacKenzie SH, Ram JL, Sowers JR. Insulin stimulates gene transcription and activity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in vascular smooth muscle cells. *Hypertension Dallas* 1992; 20: 443.
2. Ferrannini E, Taddei S, Santoro D, et al. Independent stimulation of glucose metabolism and $\text{Na}^+\text{-K}^+$ exchange by insulin in the human forearm. *Am J Physiol* 1988; 255: E953-8.
3. Moore RD. Effects of insulin upon ion transport. *Biochim Biophys Acta* 1983; 737: 1-49.
4. Zemel MB, Iannucci A, Moore JW. Role of insulin in regulating vascular smooth muscle $\text{Ca}^{++}\text{-ATPase}$ expression. *J Vasc Med Biol* 1993; 4: 79-84.
5. Baron A. Hemodynamic actions of insulin. *Am J Physiol* 1994; 267: E187-202.
6. Touyz RM, Tolloczko B, Schiffrin EL. Insulin attenuates agonist-evoked calcium transients in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1994; 23: 1-25-8.
7. Kahn AM, Seidel CL, Allen JC, O'Neil RG, Shelat H, Song T. Insulin reduces contraction and intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle. *Hypertension* 1993; 22: 735-42.
8. Kim YC, Zemel MB. Insulin increases vascular smooth muscle recovery from intracellular calcium loads. *Hypertension* 1993; 22: 74-7.
9. Anderson EA, Mark AL. The vasodilator action of insulin. Implications for the insulin hypothesis of hypertension. *Hypertension* 1993; 21: 136-40.
10. Frank HJL, Levin ER, Hu RM, Pedram A. Insulin stimulates endothelin binding and action on cultured vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 1993; 133: 1092-7.
11. Stout MA, Diecke FPJ. ^{45}Ca distribution and transport in saponin skinned vascular smooth muscle. *J*

- Pharmac Exp Therap* 1983; 225: 102-11.
12. Bers DM, Patton CW, Nuccitelli R. A practical way to the preparation of Ca^{2+} buffers. *In: Methods in Cell Biology* 1994 Vol 40, pp 3-29. R. Nuccitelli (ed) New York: Academic Press.
 13. Chen LJ, McNeill JR, Wilson TW, Gopalakrishnan V. Heterogeneity in vascular smooth muscle responsiveness to angiotensin II. Role of endothelin. *Hypertension* 1995; 26: 83-8.
 14. Félétou M, Moreau N, Duhault J. Vascular responsiveness in young, diabetic, and aging hyperinsulinemic rats. *Life Sci* 1994; 54: 1801-13.
 15. DJ Fulton, Hogson WC, Sikorski BW, King BG. Attenuated response to endothelin-1, KCl and $CaCl_2$, but not noradrenaline, of aorta from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Br J Pharmacol* 1991; 104, 928-32.
 16. Hattori Y, Kawasaki H, Kanno M, Gando S, Fukao M. Attenuated contractile response of diabetic rat aorta to caffeine but not to noradrenaline in Ca-free medium. *Eur J Pharmacol* 1994; 256: 215-9.
 17. Rinaldi GJ, Cingolani HE. Effect of diabetes on fast response to norepinephrine in rat aorta. *Diabetes* 1992; 41: 30-4.
 18. Baba T, Neugebauer S. The link between insulin resistance and hypertension. *Drugs* 1994; 47: 383-404.

... writing is not just a matter of exactitude, clarity and discretion, important though these qualities certainly are, writing is tremendous fun, it is a form of self-indulgence of positive pleasure, a business in which one needs, not only a steering wheel and a good strong brake but a good strong engine as well.

... escribir no es solamente una cuestión de exactitud, claridad y discreción, ya que pese a la indudable importancia de estas cualidades, escribir es tremendamente divertido, es una forma de placentera auto-indulgencia, es un asunto que requiere no sólo un buen volante sino tanto un buen freno como un robusto motor.

Quentin Bell

Ruskin by Quentin Bell. New York: George Braziller, 1978, p 11