
Expresión de la proteína bomba de calcio de retículo sarcoendoplásmico en el músculo masetero.

Di Croce DE¹, Trinks PW², de la Cal C¹, Takara D¹, Sánchez GA¹

¹ Cátedra de Biofísica, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires.

² Cátedra de Anatomía, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires.

Recibido 09/04/12

Aceptado 25/06/12

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue caracterizar las isoformas de la calcio ATPasa de retículo sarcoendoplásmico (SERCA) del músculo masetero y compararlas con las del músculo esquelético rápido. Se disecaron muestras de músculo masetero y esquelético rápido de conejo. La composición de fibras musculares se determinó por técnicas histológicas estándar. La SERCA se aisló por centrifugación diferencial y las isoformas se determinaron por ELISA. La actividad enzimática de la SERCA se determinó por método colorimétrico y la capacidad de transporte de calcio por método radioisotópico. Las diferencias de actividad enzimática y transporte de calcio se analizaron por la prueba *t* de Student, la distribución del tipo de fibras y las isoformas de la SERCA a través de la prueba de Fisher, y se correlacionaron haciendo uso del análisis de Spearman ($p < 0,05$). El músculo masetero reveló una composición heterogénea de fibras musculares lentas tipo I y rápidas tipo IIB. La isoforma SERCA1 predominó en el músculo esquelético rápido (90,5%), mientras que en el masetero se encontró una combinación de isoformas: 62-78 % correspondió a SERCA2, 20-37 % a SERCA1 y el contenido de SERCA3 fue despreciable. El masetero evidenció un contenido significativo de la SERCA2b. La actividad enzimática y la capacidad de transporte de calcio resultaron significativamente menores en el músculo masetero y se correlacionaron con el contenido de la SERCA2b. Concluimos que la combinación de diferentes isoformas, junto con una proporción substancial de SERCA2b, podría explicar la menor actividad enzimática y capacidad de transporte de calcio en el músculo masetero.

Palabras clave: retículo sarcoplásmico, calcio-ATPasa, transporte de calcio, músculo masetero, músculos masticadores.

ABSTRACT

Expression of sarcoendoplasmic reticulum Ca-ATPase (SERCA) in masseter muscle.

The aim of the study was to characterize the sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca-ATPase (SERCA) isoforms expressed in masseter compared to fast-twitch muscle. Masseter and fast-twitch muscles were sampled from rabbit and fiber type composition was determined by histological standard methods. SERCA was isolated by differential centrifugation. Anti-SERCA1/2/3 IgG was used to determine the SERCA isoform by ELISA. SERCA activity was determined with a colorimetric method and calcium transport capability by a radioisotopic technique. Activity and calcium transport were tested for significance by Student's *t* test, the distribution of isoforms assessed by Fisher exact test and correlated by Spearman analysis ($p < 0.05$). The masseter fiber type composition was a mixture of slow type I and fast type IIB fibers. SERCA1 was predominant (90.5%) in fast-twitch muscle, while a mixture of SERCA isoforms was found in masseter: 62-78% was SERCA2, 20-37% was SERCA1 and SERCA3 was negligible. Masseter revealed a significant content of SERCA2b. Ca-ATPase activity and calcium transport capability was significantly lower in masseter compared to fast-twitch muscle preparations and showed higher correlation with the content of SERCA2b. It is concluded that the mixture of different SERCA isoforms, along with a substantial content of SERCA2b, in masseter muscle would support lower Ca-ATPase activity and calcium transport.

Keywords: sarcoplasmic reticulum, calcium-transporting ATPases, calcium transport, masseter muscle, masticatory muscles.

INTRODUCCIÓN

Los músculos masticadores se encuentran heterogéneamente compuestos por fibras musculares rápidas y lentas (Sano et al., 2007; Korfage et al., 2005). Están comprometidos en una amplia variedad de funciones del aparato estomatognático, tales como la masticación, deglución, fonación y la posición de la mandíbula (Grünheid et al., 2009; De Jong et al., 2011). Funcionalmente, los músculos masticadores, pueden clasificarse en principales y accesorios. Los principales son todos aquellos músculos que tienen inserción en el maxilar inferior, y por ende, ejercen una acción directa sobre dicho hueso. Dentro de este grupo de músculos podemos mencionar a los elevadores, depresores y estabilizadores. El masetero pertenece al grupo de los elevadores. Embriológicamente deriva del primer arco branquial, y en el recién nacido ya se presenta con dos fascículos: uno superficial y otro profundo. En esta etapa del desarrollo el músculo colabora en la acción de succión junto con otros músculos, y cuando erupcionan los molares, adquiere un papel preponderante en la masticación. En el individuo adulto, el masetero es el músculo más desarrollado y potente de los elevadores (Figún y Garino, 1992).

La calcio ATPasa (Ca-ATPasa) de retículo sarcoplásmico es una proteína intrínseca de membrana responsable del transporte activo de calcio desde el mioplasma al lumen del retículo, promoviendo así, la relajación muscular (Toyoshima e Inesi, 2004). Pertenece a una familia de enzimas conocidas como SERCA o Ca-ATPasas de retículo sarcoendoplásmico (Lytton et al., 1992). La isoforma SERCA1 se expresa en músculo esquelético rápido, la variante SERCA1a lo hace en el músculo adulto, mientras que la variante SERCA1b se encuentra en el músculo del neonato (Grover et al., 1992). La isoforma SERCA2 se encuentra en el músculo esquelético lento y en el músculo cardíaco tanto en el adulto como en el neonato (Vangheluwe et al., 2005; Periasamy et al., 2008). La variante SERCA2a se expresa exclusivamente en músculo cardíaco y músculo esquelético lento, y la variante SERCA2b lo hace en el músculo liso y en tejidos no musculares. Una tercera isoforma, SERCA3, se ha descripto preliminarmente en tejidos no

musculares (Dode et al., 2002). Todas las isoformas descriptas comparten básicamente la misma estructura primaria e inserción topográfica en la membrana reticular, transportan al ion calcio en presencia de ATP y son inhibidas selectivamente por tapsigargina (Lytton et al., 1991). La Ca-ATPasa de retículo sarcoplásmico de músculo esquelético rápido, es un modelo ampliamente utilizado, dado que, se ha caracterizado ampliamente desde el punto de vista cinético, energético, estructural y funcional (Champeil et al., 1985; Alonso et al., 1998; Berman, 1999; Lee, 2002; Toyoshima e Inesi, 2004; Peinelt y Apell, 2005; Kjelstrup et al., 2008; Endo, 2009; Hinsén et al., 2010; Inesi, 2011). Por tal motivo, ha sido un modelo conveniente para estudiar el/ los efectos inhibitorios y/ o activadores de diferentes agentes lipofílicos (Takara y Alonso, 1996; Karon et al., 1999; Bartolommei et al., 2008; Bartolommei et al. 2011). Nuestro laboratorio ha estudiado también a esta proteína transportadora de calcio desde hace varios años (Garrahan et al., 1976; Alonso et al., 1981; Alonso et al., 1990; Alonso et al., 1998). Con el propósito de estudiar sistemas aún no descriptos en la literatura, tales como la Ca-ATPasa de músculos masticadores, a fin de interpretar si las modificaciones funcionales causadas por los anestésicos locales de uso odontológico, podrían inducir una contracción sostenida o rigidez muscular por aumento del calcio citosólico, se ha estudiado inicialmente la interacción de la carticaína con la Ca-ATPasa de retículo sarcoplásmico de músculo esquelético rápido (Takara et al., 2000; Takara et al., 2005). Pocos autores se han dedicado al estudio de la Ca-ATPasa de músculos masticadores (Okabe et al., 1985; Sánchez et al., 2004). Este equipo de investigación ha sido el primero en caracterizar la Ca-ATPasa del músculo masetero y pterigoideo interno (Sánchez et al., 2004) y, recientemente, la del músculo temporal (Sánchez et al., 2012a), informando una menor actividad y captación de calcio de la enzima en comparación al músculo esquelético rápido. Dado que la presencia de una combinación particular de SERCAs, propia de los músculos

masticadores, podría explicar dichas diferencias, el objetivo del trabajo fue identificar las isoformas de la SERCA presentes en el músculo masetero de conejo y correlacionarlas con la distribución del tipo de fibra muscular, actividad enzimática y capacidad de transporte de calcio.

MATERIALES Y METODOS

Se disecaron músculos maseteros y músculos esqueléticos rápidos de espalda de conejo macho neozelandés (2 kg de peso y 6 meses de edad). Identificamos los tipos de fibras musculares presentes usando la técnica descrita por Brooke y Kaiser (1970). Paralelamente, aislamos membranas de retículo sarcoplásmico por centrifugación diferencial según la técnica de Champeil et al. (1985). La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry et al. (1951), empleando seroalbúmina bovina como estándar. El protocolo para el cuidado y manejo de los animales de experimentación fue aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Odontología de la UBA.

La identificación de las isoformas de la Ca-ATPasa se realizó por el método de ELISA, utilizando la técnica descrita por Leberer y Pette (1986), empleando IgG anti-SERCA1/2/3. Para la determinación de la actividad enzimática de la Ca-ATPasa, incubamos las vesículas de retículo sarcoplásmico (1 mg/ ml) durante 2 minutos y a 37°C en medios conteniendo buffer MOPS-TRIS 50 mM (pH 7.2), ATP 3 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 3 mM, CaCl₂ 0,1 mM, EGTA 0,1 mM y 10⁻⁶ M calcimicina (ionóforo de calcio A 23187). La reacción se inició por adición de las

membranas de retículo sarcoplásmico y se detuvo por adición de ácido tricloroacético 5 % (concentración final). Posteriormente, centrifugamos los medios y determinamos la concentración de fosfato inorgánico (Pi) en los sobrenadantes usando el método de Baginski et al. (1967). Dicha concentración de Pi se tomó como índice de la actividad enzimática. Paralelamente se ensayaron blancos sin membranas de retículo sarcoplásmico y se restaron a los datos experimentales.

La determinación de la captación de calcio dependiente de ATP se realizó por método radioisotópico. Se incubaron vesículas de retículo sarcoplásmico a 37°C durante 30 segundos en presencia de ⁴⁵Ca(CaCl₂) 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, ATP 3 mM, MgCl₂ 3 mM, buffer MOPS-TRIS 50 mM (pH 7,2). Las reacciones se iniciaron por la adición de vesículas de retículo sarcoplásmico (1 mg/ ml) al medio de reacción y se detuvieron filtrando el medio a través de filtros Millipore (poro promedio de 0,45 μm). Los filtros se lavaron profusamente con solución de LaCl₃ 3mM. La radiactividad retenida en los filtros se midió en un contador de centelleo líquido Beckman LS 6500. Blancos sin ATP se ensayaron en paralelo y se restaron a los valores experimentales.

En este trabajo utilizamos reactivos de calidad analítica. La seroalbúmina bovina, los buffers MOPS y TRIS, el ATP disódico y la calcimicina se adquirieron a Sigma (St. Louis, MO, USA). Los anticuerpos IgG anti-SERCA1/2/3 se adquirieron a Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA).

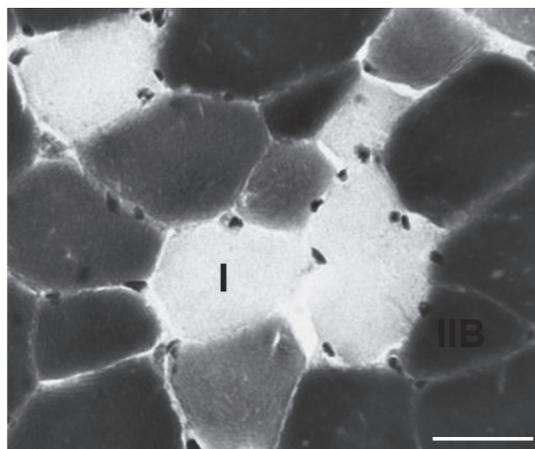


Figura 1. Identificación de fibras tipo I y IIB en músculo masetero. Corte transversal de una muestra tipo de músculo masetero procesada según Brooke et al. (1970). Barra: 100 μm

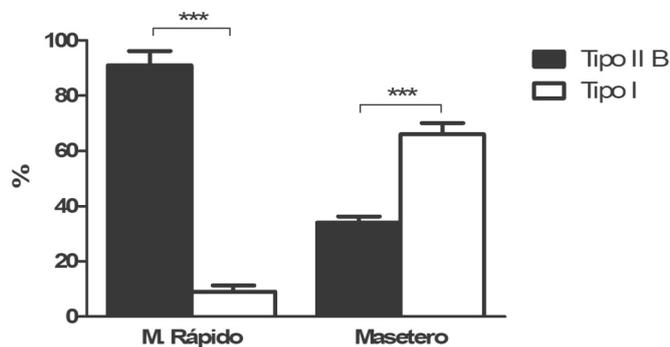


Figura 2. Distribución del tipo de fibras en músculo masetero y esquelético rápido. Proporción de fibras blancas rápidas (IIB) y rojas lentas (I) obtenida según técnica histológica. Las barras de error indican el error estándar (n = 8). M. Rápido: músculo esquelético rápido. ***Diferencia estadísticamente significativa, p < 0.001.

El análisis de los datos incluyó el cálculo de la media aritmética y del error estándar correspondientes a la actividad enzimática y a la captación de calcio. Las diferencias entre medias se analizaron mediante la prueba t de Student haciendo uso de GRAPHPAD Prism versión 5.03 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). La distribución de las isoformas de las SERCAs se analizó aplicando la prueba exacta de Fisher. Los diferentes tipos de isoformas de la SERCA se correlacionaron con la actividad enzimática y el transporte de calcio, usando el análisis de correlación de Spearman. El nivel de significación empleado fue $p < 0,05$.

RESULTADOS

La Figura 1 muestra una imagen típica de la distribución de fibras musculares en el músculo masetero de conejo. Las fibras de color blanco o gris claro corresponden a fibras musculares tipo I (fibras lentas), mientras que las fibras de color gris oscuro corresponden a fibras musculares tipo IIB (fibras rápidas). A diferencia del músculo esquelético rápido, la proporción de fibras tipo I resultó significativamente mayor en el músculo masetero (figura 2).

El contenido de SERCA de las membranas aisladas de músculo esquelético rápido fue de un 70%, mientras que en el músculo masetero fue del 66%. Sin embargo, el contenido de SERCA no fue significativamente diferente entre los músculos (figura 3A).

El método de ELISA permitió identificar y determinar la distribución de las diferentes isoformas de SERCA (figuras 3B, C y D). El contenido de SERCA3 fue prácticamente despreciable ($< 1\%$) en ambos tipos de músculo.

En el músculo masetero se observó una mayor proporción de SERCA2, mientras que el músculo esquelético rápido predominó la isoforma SERCA1 (figura 3B). De la isoforma SERCA1, se halló una mayor proporción de SERCA1a en ambos tipos de tejido muscular (figura 3C). En cuanto a la SERCA2, el músculo masetero evidenció una expresión significativamente mayor de las isoformas SERCA2a y SERCA2b en comparación con el músculo esquelético rápido (figura 3D).

La actividad Ca-ATPásica del músculo masetero resultó significativamente menor ($t(14) = 9,28$) que la encontrada en el músculo esquelético rápido (figura 4A) al igual que la capacidad de transporte de calcio ($t(14) = 6,68$; Figura 4B).

La Tabla 1 muestra la matriz de correlaciones entre las isoformas de la SERCA, tipo de fibras musculares, actividad enzimática y capacidad de transporte de calcio. Los resultados indican que la isoforma SERCA2b, substancialmente presente en músculo masetero, se correlaciona significativamente con la disminución de la actividad enzimática y del transporte de calcio, mientras que la isoforma SERCA1a, principalmente presente en el músculo esquelético rápido se correlaciona significativamente con el incremento de la actividad de la enzima y de la captación de calcio.

DISCUSIÓN

En este trabajo describimos la distribución de las isoformas de la SERCA en el músculo masetero de conejo y su impacto sobre la actividad enzimática y la capacidad de transporte de calcio, siendo este el primer estudio

	Actividad SERCA	Captación de calcio	Fibra Tipo I	Fibra Tipo II B
SERCA1a	0,83 ^{***}	0,86 ^{***}	0,21	0,96 ^{***}
SERCA1b	-0,87 ^{***}	-0,71 ^{***}	0,12	0,89 ^{***}
SERCA2a	-0,81 ^{***}	-0,78 ^{***}	0,95 ^{***}	0,12
SERCA2b	-0,93 ^{***}	-0,95 ^{***}	0,97 ^{***}	0,14

Tabla 1. Correlación entre isoformas de la SERCA, tipo de fibras musculares, actividad enzimática y transporte de calcio. Se indican los valores del coeficiente rho de Spearman. ***Estadísticamente significativo, $p < 0,001$.

que, de modo preliminar, aborda este tema de interés odontológico. El conocimiento acerca de la distribución de la SERCA no solo contribuye a mejorar la comprensión de la fisiología de los músculos masticadores, sino que también permite interpretar su comportamiento en condiciones patológicas o ante la administración infiltrativa de fármacos en la región masticatriz (Sánchez et al., 2010a; Sánchez et al., 2010b; Sánchez et al., 2012b).

La distribución del tipo de fibras musculares tipo I y tipo IIB en el músculo masetero que informamos en este trabajo, refleja la composición heterogénea de dicho músculo de acuerdo con publicaciones previas (Korfage et al., 2005; Sano et al., 2007).

El contenido de la SERCA de una preparación de tejido muscular representa una variable de interés en el estudio de la actividad enzimática, dado que las diferencias observadas en la actividad enzimática de diferentes preparaciones de tejido muscular pueden explicarse en base a esta variable. En este estudio no observamos diferencias entre el contenido total de la SERCA en el músculo masetero en comparación al músculo esquelético rápido. Este resultado permite descartar a la variable en cuestión como una variable capaz de explicar la menor actividad enzimática de la SERCA observada en músculos masticadores (Sánchez et

al., 2004; Sánchez et al., 2012a). Resulta de interés mencionar que el contenido de la SERCA del músculo esquelético rápido informado en este trabajo no difiere del descrito por otros autores (Inesi y Toyoshima, 2004).

Un resultado significativo de este estudio es la presencia de la SERCA2b en el músculo masetero. Si bien esta isoforma ha sido descrita en el músculo liso y en tejidos no musculares (Vangheluwe et al., 2005; Periasamy et al., 2008), nuestros resultados sugieren una localización alternativa de la enzima en los músculos masticadores. Además, la isoforma SERCA2b no ha sido descrita en los músculos esqueléticos rápidos de los miembros inferiores y/ o superiores (Grover y Khan, 1992). En este sentido, nuestro resultado indicaría una nueva diferencia fenotípica entre los músculos masticadores y los músculos esqueléticos rápidos. A su vez, resulta interesante comentar que las propiedades fenotípicas de los músculos masticadores dependen en gran medida de la especie y de la funcionalidad de los mismos, evidenciando la expresión de variantes de diferentes proteínas miofibrilares no descritas en los músculos esqueléticos rápidos (Kang et al., 2010). Por consiguiente, podría esperarse variabilidad en la expresión de la SERCA de los músculos masticadores entre los grupos de músculos elevadores y depresores y entre

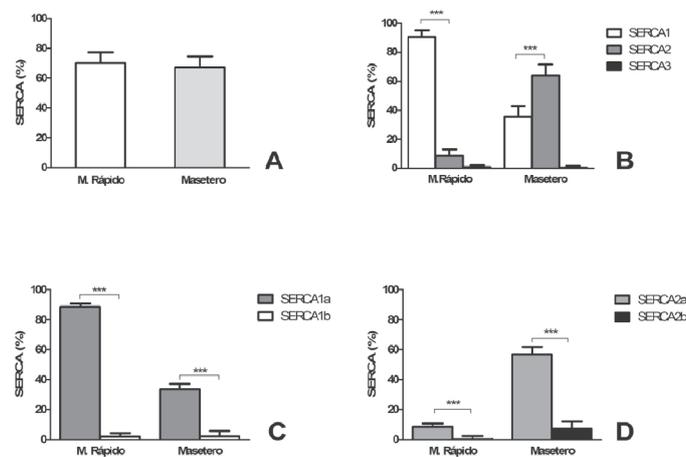


Figura 3. Expresión de SERCA en músculo masetero y esquelético rápido.

(A) Proporción de SERCA. (B) Distribución de las isoformas de SERCA.
 (C) Distribución de las isoformas de SERCA1. (D) Distribución de las isoformas de SERCA2. Las barras de error indican el error estándar (n = 8). M. Rápido: músculo esquelético rápido. ***Diferencia estadísticamente significativa, $p < 0,001$.

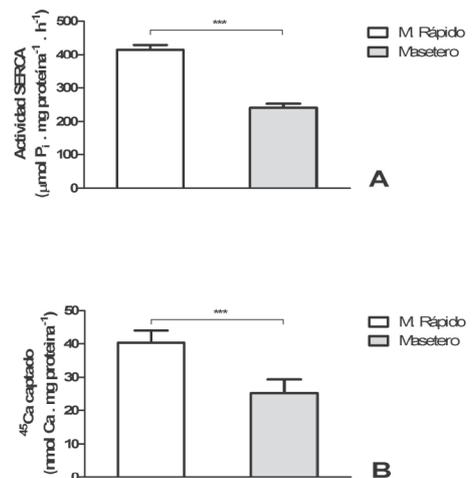


Figura 4. Evidencias funcionales de la SERCA en músculo masetero y esquelético rápido.

(A) Actividad enzimática. (B) Captación de calcio ATP-dependiente. Las barras de error indican el error estándar (n = 8). M. Rápido: músculo esquelético rápido. ***Diferencia estadísticamente significativa, $p < 0,001$.

diferentes especies. La presencia prácticamente despreciable de la isoforma SERCA3 en el músculo masetero concuerda con la localización en tejidos no musculares descripta para esta isoforma (Dode et al., 2002).

Lytton et al. (1992) describieron las propiedades de la SERCA1, SERCA2a y SERCA2b. Los autores informaron que la SERCA1 y la SERCA2a son idénticas en lo referente a la actividad enzimática y a la capacidad de transporte de calcio, pero describieron una cinética enzimática más lenta para la SERCA2b. Ello sugiere que la proporción significativa de SERCA2b informada en este trabajo en el músculo masetero puede explicar la menor actividad enzimática y capacidad de transporte de calcio observada en preparaciones de este músculo masticador (Sánchez et al., 2004), y posiblemente la observada en el músculo temporal (Sánchez et al., 2012a). El análisis de correlación efectuado en este estudio avala esta hipótesis. Nótese que la correlación inversa más marcada se registró entre la presencia de la isoforma SERCA2b y la actividad enzimática y el transporte de calcio respectivamente.

Los resultados informados en este trabajo nos permiten concluir que la presencia substancial de la SERCA2b, junto con la combinación de la presencia de la SERCA1 y la SERCA2a, explicaría la menor actividad enzimática y capacidad de transporte de calcio observada en preparaciones del músculo masetero en comparación al músculo esquelético rápido.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso GL, Arrigó DM, Soliz-Friedlmeier MV. Steady state determination of sarcoplasmic reticulum ATPase intermediates. Their acid lability. *J Biol Chem* 1981;256(7):3399-404.
- Alonso GL, Takara D, González DA. Direct demonstration of an acid-labile phosphoenzyme in the cycle of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -dependent adenosinetriphosphatase. *Biochim Biophys Acta* 1990;1030(1):172-75.
- Alonso GL, González DA, Takara D, Ostuni MA, Sánchez GA. Calcium additional to that bound to the transport sites is required for full activation of the sarcoplasmic reticulum Ca -ATPase from skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1998;1405(1/3):47-54.
- Baginski ES, Foa PP, Zak B. Microdetermination of inorganic phosphate, phospholipids, and total phosphate in biologic materials. *Clin Chem* 1967;13(4):326-32.
- Bartolommei G, Tadini-Buoninsegni F, Moncelli MR, Guidelli R. Electrogenic steps of the SR Ca -ATPase enzymatic cycle and the effect of curcumin. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(2):405-13.
- Bartolommei G, Tadini-Buoninsegni F, Moncelli MR, Gemma S, Camodeca C, Butini S et al. The Ca^{2+} -ATPase (SERCA 1) is inhibited by 4-aminoquinoline derivatives through interference with catalytic activation by Ca^{2+} , whereas the ATPase E2 state remains functional. *J Biol Chem* 2011;286(44):38383-9.
- Berman MC. Regulation of Ca^{2+} transport by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase at limiting (Ca^{2+}). *Biochim Biophys Acta* 1999;1418(1):48-60.
- Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 1970;23(4):369-79.
- Champeil P, Guillain F, Vénien C, Gingold MP. Interaction of magnesium and inorganic phosphate with calcium-deprived sarcoplasmic reticulum adenosinetriphosphatase as reflected by organic solvent induced perturbation. *Biochemistry* 1985;24(1):69-81.
- De Jong WC, Korfage JA, Langenbach GE. The role of masticatory muscles in the continuous loading of the mandible. *J Anat* 2011;218(6):625-36.
- Dode L, Vilsen B, Van Baelen K, Wuytack F, Clausen JD, Andersen JP. Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) 1 and 3 isoforms by steady-state and transient kinetic analyses. *J Biol Chem* 2002;277(47):45579-91.
- Endo M. Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol Rev* 2009;89(4):1153-76.
- Figún ME, Garino RR. *Miología: músculos masticadores*. En: *Anatomía odontológica funcional y aplicada*. Buenos Aires: El Ateneo; 1992. p. 53-8.
- Garraban PJ, Rega AF, Alonso GL. The interaction of magnesium ions with the calcium pump of sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1976;448(1):121-32.

- Grover AK, Khan I. Calcium pump isoforms: diversity, selectivity and plasticity. Review article. *Cell Calcium* 1992;13(1):9-17.
- Griinbeid T, Langenbach GE, Korfage JA, Zentner A, van Eijden TM. The adaptive response of jaw muscles to varying functional demands. *Eur J Orthod* 2009;31(6):596-612.
- Hinsén K, Beaumont E, Fournier B, Lacapère JJ. From electron microscopy maps to atomic structures using normal mode-based fitting. *Methods Mol Biol* 2010;654:237-58.
- Inesi G, Toyoshima C. Catalytic and transport mechanism of the sarco-(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA). En: Futai M, Wada Y y Kaplan JH, eds. *Handbook of ATPases: Biochemistry, Cell Biology, Pathophysiology*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.; 2004;63-87.
- Inesi G. Calcium and copper transport ATPases: analogies and diversities in transduction and signaling mechanisms. *J Cell Commun Signal* 2011;5(3):227-37.
- Kang LH, Rughani A, Walker ML, Bestak R, Hob JF. Expression of masticatory-specific isoforms of myosin heavy-chain, myosin-binding protein-C and tropomyosin in muscle fibers and satellite cell cultures of cat masticatory muscle. *J Histochem Cytochem* 2010;58:623-34.
- Karon BS, Antry JM, Shi Y, Garnett CE, Inesi G, Jones LR, Kutcbai H, Thomas DD. Different anesthetic sensitivities of skeletal and cardiac isoforms of the Ca -ATPase. *Biochemistry* 1999;38(29):9301-07.
- Kjelstrup S, de Meis L, Bedeaux D, Simon JM. Is the Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum also a beat pump? *Eur Biophys J* 2008;38(1):59-67.
- Korfage JA, Koolstra JH, Langenbach GE, van Eijden TM. Fiber-type composition of the human jaw muscles (part 1) origin and functional significance of fiber-type diversity. *J Dent Res* 2005;84(9):774-83.
- Leberer E, Pette D. Immunochemical quantification of sarcoplasmic reticulum Ca -ATPase, of calsequestrin and of parvalbumin in rabbit skeletal muscles of defined fiber composition. *Eur J Biochem* 1986;156(3):489-96.
- Lee AG. Ca^{2+} -ATPase structure in the E1 and E2 conformations: mechanism, helix-helix and helix-lipid interactions. *Biochim Biophys Acta* 2002;1565(2):246-66.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
- Lytton J, Westlin M, Hanley MR. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca -ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem* 1991;266(26):17067-71.
- Lytton J, Westlin M, Burk SE, Shull GE, MacLennan DH. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem* 1992;267(20):14483-9.
- Okabe E, Kobno H, Kato Y, Odajima C, Ito H. Characterization of the effect of pH on the excitation-contraction coupling system of canine masseter muscle. *Jpn J Pharmacol* 1985;37(3):277-83.
- Peinelt C and Apell HJ. Kinetics of Ca^{2+} binding to the SR Ca -ATPase in the E1 state. *Biophys J* 2005;89(4):2427-33.
- Periasamy M, Bhupathy P, Babu GJ. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovasc Res* 2008;77(2):265-73.
- Sánchez GA, Takara D, Toma AF, Alonso GL. Characteristics of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -dependent ATPase from masticatory muscles. *J Dent Res* 2004;83(7):557-61.
- Sánchez GA, Casadoumeq AC, Alonso GL, Takara D. Inhibitory effect of lidocaine on the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -dependent ATPase from temporalis muscle. *Acta Odontol Latinoam [Internet]*. 2010a [citado junio 2013]; 23(2):92-8. Disponible en: <http://www.actaodontologicalat.com/archivo/v23n2/fulltext/articulo3.pdf>
- Sánchez GA, Takara D, Alonso GL. Local anesthetics inhibit Ca -ATPase in masticatory muscles. *J Dent Res* 2010b;89(4):372-7.
- Sánchez GA, Di Croce DE, Casadoumeq AC, Richard SB, Takara D. Characterization of the sarcoplasmic reticulum Ca -ATPase from rabbit temporalis muscle. *Arch Oral Biol* 2012a; 57(10):1429-37.
- Sánchez GA, Di Croce DE, Richard SB, Takara D. Effect of articaine on calcium transport in sarcoplasmic reticulum membranes isolated from medial pterygoid muscle. *Acta Odontol Latinoam [Internet]*. 2012b [citado junio 2013]; 25(1):34-9. Disponible en: <http://www.actaodontologicalat.com/archivo/v25n1/fulltext/art06.pdf>
- Sano R, Tanaka E, Korfage JA, Langenbach GE, Kawai

N, van Eijden TM, Tanne K. Heterogeneity of fiber characteristics in the rat masseter and digastric muscles. *J Anat* 2007;211(4):464-70.

Takara D, Alonso GL. Effect of haloperidol on the sarcoplasmic reticulum Ca-dependent adenosine triphosphatase. *Biochim Biophys Acta* 1996;1314(1/2):57-65.

Takara D, Sánchez GA, Alonso GL. Effect of carticaine on the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-dependent adenosine triphosphatase. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;362(6):497-503.

Takara D, Sánchez GA, Toma AF, Bonazzola P, Alonso GL. Effect of carticaine on the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-adenosine triphosphatase, II. Cations dependence. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2005;371:375-82.

Toyoshima C, Inesi G. Structural basis of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 2004;73:269-92.

Vangheluwe P, Raeymaekers L, Dode L, Wuytack F. Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications. *Cell Calcium* 2005;38(3/4):291-302.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con subsidios de la Universidad de Buenos Aires (UBACyT 20020090200165 y UBACyT 20020110100082).

Dirección para correspondencia:

Dr. Gabriel Sánchez

Cátedra de Biofísica

Facultad de Odontología Universidad de Buenos Aires

M T de Alverar 2142, piso 17 B - CP C1122AAH - CABA

TEL: (54-11) 4964 12 98 - FAX: (54-11) 4508 39 58

e-mail: gabriel@odon.uba.ar