

Caracterización de receptores muscarínicos en células indiferenciadas tiroideas de ratas Fisher

CHARACTERIZATION OF UNDIFFERENTIATED MUSCARINIC THYROID CELLS IN FISHER RATS

Introduction: The parasympathetic autonomous nervous system exerts control over thyroid function by activation of the muscarinic receptors in follicular cells. Various pharmacological and molecular subtypes of muscarinic receptors (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , M_5) have been identified in central nervous system and peripheral tissues. Controversy surrounds receptor characterization in thyroid cells.

Materials and methods: Undifferentiated Fisher rat thyroid epithelial cells (FRT) were cultured. Association and dissociation kinetics assays and antagonist competition studies of the binding of 3H -N-methylscopolamine (3H -NMS) to muscarinic receptors were performed to demonstrate the presence of muscarinic receptors.

Results: Specific muscarinic receptors in the plasma membrane of FRT cells were observed with an equilibrium dissociation constant (K_d) of 0.44 nmol. The order of affinities obtained fitting the data to one binding site model in competition experiments with the muscarinic receptor antagonist was: dicyclomine > hexahydrosiladifenidol (HHSD) = 4-diphenylacetoxi-N-methylpiperidine methiodide (4-DAMP) > pirenzepine > himbacine = 11-[[2-[(diethylamino)methyl]-1-piperidinyl]acetyl]-5,11-dihydro-6H-pyrido(4,14)benzodiazepine (AF-DX 116).

Conclusions: The results obtained indicate the existence of specific 3H -NMS muscarinic binding sites located in the plasma membrane of FRT cells. The results obtained in competition experiments suggest that the receptors present in FRT cells belong to the M_3 subtype.

Key words: Muscarinic receptor subtypes. Fisher rat thyroid epithelial cells. Thyroid.

FRANCISCO BOTELLA ROMERO^A, ELISA MARTÍN MONTAÑEZ^B, EUGENIO JIMÉNEZ GUTIÉRREZ^C Y JOSÉ PAVÍA MOLINA^B

^aSección de Endocrinología y Nutrición. Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. Facultad de Medicina. Universidad de Castilla La Mancha. Albacete. España.

^bDepartamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad de Málaga. Málaga. España.

^cDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad de Málaga. Málaga. España.

Introducción: El sistema nervioso autónomo parasimpático tiene el control de la función tiroidea mediante la activación de receptores muscarínicos en las células foliculares. Se han identificado diversos subtipos farmacológicos y moleculares de receptores muscarínicos (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , M_5) tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en los tejidos periféricos, pero hay controversia acerca de su caracterización en las células tiroideas.

Material y métodos: Cultivos celulares de células epiteliales tiroideas indiferenciadas de ratas Fisher (FRT). Estudios de unión de receptores a radioligando: cinéticas de asociación, cinéticas de disociación y competiciones entre diversos fármacos antagonistas selectivos muscarínicos; se utiliza, como radioligando, 3H -N-metil-escopolamina (3H -NMS).

Resultados: Se observa que hay receptores específicos muscarínicos en la membrana plasmática de las células FRT con una constante de disociación en equilibrio (K_d) de 0,44 nmol. El orden de afinidades de los diferentes antagonistas muscarínicos encontrado en membranas epiteliales de células FRT mediante el ajuste de los datos para un modelo de un solo sitio de unión fue: dicyclomina > hexahidrosiladifenidol (HHSD) = 4-difenilacetoxi-N-metilpiperidina metiodida (4-DAMP) > pirenzepina > himbacina = 11-[[2-[(dietil-amino)metil]-1-piperidinil]acetyl]-5,11-dihidro-6H-pirido(4,14)benzodiazepina (AF-DX 116).

Conclusiones: Los resultados obtenidos en este estudio indican que hay sitios de unión para 3H -NMS que se corresponden con los receptores muscarínicos localizados en células FRT. Los resultados obtenidos en los experimentos de competición indican que el receptor presente en esta localización se corresponde con el subtipo M_3 .

Palabras clave: Subtipos de receptores muscarínicos. Células epiteliales tiroideas de ratas Fisher. Tiroides.

Correspondencia: Dr. F. Botella Romero.

Sección de Endocrinología y Nutrición. Hospital General Universitario de Albacete. Hnos. Falcó, 37. 02006 Albacete. España.

Correo electrónico: fbotellar@sescam.jccm.es

Manuscrito recibido el 29-12-2008 y aceptado para su publicación el 16-3-2009.

INTRODUCCIÓN

Hay evidencia de que el sistema nervioso vegetativo (simpático y parasimpático) controla la función tiroidea en el ser humano mediante innervación colinérgica y adrenérgica en las células foliculares¹. Adicionalmente, se ha demostrado el acúmulo de guanosinmonofosfato cíclico (GMPc) en el tejido tiroideo humano en respuesta a agentes colinérgicos que es inhibido selectivamente por la atropina, antagonista del receptor muscarínico, pero no por la d-tubocurarina, antagonista del receptor nicotínico². Estos resultados apoyan la idea de un papel del sistema nervioso colinérgico en la regulación de la función tiroidea.

Los receptores colinérgicos muscarínicos se encuentran en diversas localizaciones en el organismo humano. Además de su amplia distribución en el sistema nervioso central (SNC), donde median funciones relacionadas con procesos de memoria y aprendizaje, también se encuentran en tejidos periféricos.

En la actualidad, se han identificado 5 subtipos de receptores muscarínicos (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 y M_5). Previamente a la descripción molecular de los 5 subtipos, 3 de ellos (M_1 , M_2 y M_3) se definieron mediante estudios de unión y técnicas farmacológicas clásicas³⁻⁵. La distribución y la localización de los subtipos de receptores muscarínicos se han estudiado ampliamente en las últimas dos décadas. En la tabla 1 se resume la principal distribución y las principales funciones de los diferentes subtipos. Así, en el organismo humano, además de presentar una amplia distribución en el sistema nervioso central, se encuentran en tejidos periféricos, como el corazón, las glándulas endocrinas y exocrinas, la fibra muscular lisa digestiva y vascular o la placenta, entre otros.

El subtipo M_1 , que en farmacología se caracteriza por presentar alta afinidad para el antagonista pirenzepina, es el subtipo receptorial predominante en el cerebro anterior, principalmente en el córtex cerebral, el hipocampo y el estriado⁶.

El subtipo M_2 está localizado preferentemente en corazón y cerebelo y muestra alta afinidad para el antagonista 11-[[2-[(dietil-amino)metil]-1-piperidinil]acetil]-5,11-dihidro-6H-pirido(414)benzodiazepina (AF-DX 116), ade-

más de estar alostéricamente regulado por compuestos del tipo de la gallamina.

El subtipo M_3 farmacológicamente se caracteriza por presentar alta afinidad para los antagonistas 4-difenilacetoxi-N-metilpiperidina metiodida (4-DAMP) y hexahidrosiladifenidol (HHSD). Además de estar ampliamente distribuido por el SNC, en la periferia participa en numerosas funciones fisiológicas; unas de sus principales localizaciones son la musculatura lisa y las glándulas exocrinas⁷⁻¹⁰.

El subtipo M_4 se encuentra preferentemente en cerebro anterior⁶. Diferentes trabajos^{11,12} indican un papel de regulación en los receptores dopaminérgicos D_1 relacionados con las funciones estriatales y la actividad locomotora. En la zona periférica, se ha localizado en pulmón de conejo, corazón de pollo y médula adrenal bovina¹³.

Finalmente, se han encontrado bajas densidades del subtipo M_5 tanto en tejido neuronal (sustancia negra y núcleo accumbens), con un posible papel modulador en la liberación de dopamina en cerebro medio y su relación con los efectos de recompensa de las drogas de abuso¹⁴, como en endotelio vascular cerebral y periférico. A pesar de que se ha identificado una gran diversidad de efectos bioquímicos, fisiológicos y en el comportamiento relacionados con la neurotransmisión colinérgica muscarínica en el cerebro, la identidad de los subtipos moleculares causales de funciones específicas en otros tejidos implicados en numerosas situaciones patológicas permanece poco clara.

En el presente trabajo nos planteamos como objetivo poner de manifiesto la existencia de receptores muscarínicos en la membrana plasmática de células epiteliales no diferenciadas y polarizadas tiroideas de ratas Fisher (FRT) y realizar la caracterización farmacológica de los subtipos de receptores muscarínicos presentes en ellas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado células epiteliales tiroideas indiferenciadas (*Fisher rat thyroid*) cultivadas en medio Ham F12 modificado por Coon, suplementado con el 5% de suero bovino,

TABLA 1. Resumen de la distribución, el acoplamiento a proteínas G y las principales respuestas funcionales de los diferentes subtipos de receptor muscarínico

Subtipo	Distribución	Proteína G	Segundos mensajeros	Respuesta funcional
M_1	Cerebro (corteza, hipocampo). Glándulas. Ganglios simpáticos	q/11	PLC; IP_3 /DAG; Ca^{2+} /PKC	(-) corrientes tipo-M
M_2	Corazón. Cerebro medio. Musculatura lisa	i/o	AC (-)	Canales K^+ ; (-) canales Ca^{2+} ; (+) fuerza y velocidad de contracción; (-) liberación NT (presináptico)
M_3	Musculatura lisa. Glándulas. Cerebro	q/11	PLC; IP_3 /DAG; Ca^{2+} /PKC	Contracción de musculatura lisa. Secreción de glándulas
M_4	Cerebro (anterior, estriado)	i/o	AC (-)	(-) canales Ca^{2+} ; (-) liberación NT (presináptico)
M_5	Cerebro (sustancia negra). Ojos	q/11	PLC; IP_3 /DAG; Ca^{2+} /PKC	

AC: adenilato ciclasa; DAG: diacilglicerol; IP_3 : inositol 1,4,5-trifosfato; PKC: proteincinasa C; PLC: fosfolipasa C; NT: neurotransmisor. Los signos - y + indican inhibición y activación respectivamente. Adaptada de Caulfield et al, 1998.

gentamicina (50 µg/ml) y anfotericina B (0,25 µg/ml). Las células se mantuvieron en incubador a 37 °C en una atmósfera con el 95% de aire y el 5% de CO₂.

Para la caracterización de los receptores colinérgicos muscarínicos presentes en la membrana plasmática de células FRT se llevó a cabo estudios de unión de receptores a radioligando: cinéticas de asociación, cinéticas de disociación y competiciones entre diversos fármacos antagonistas muscarínicos. El radioligando empleado fue ³H-N-metil-escopolamina (³H-NMS), antagonista no selectivo que no discrimina entre los diferentes subtipos de receptores muscarínicos. Los fármacos antagonistas muscarínicos utilizados en los estudios de competición fueron los siguientes: pirenzepina, AF-DX 116, himbacina, 4-DAMP, dicitolmina y HHSD. Los datos se analizaron con el programa iterativo LIGAND, modificado por Mc Pherson¹⁵. Los coeficientes de Hill (nH) se obtuvieron ajustando los datos de los experimentos de unión a una ecuación logística de 4 parámetros con el programa de gráficos GraphPad Prism (v. 2.01). Las proteínas se midieron con el método de Lowry et al¹⁶, empleando albúmina bovina (BSA) como estándar.

RESULTADOS

Los experimentos cinéticos realizados sobre la unión del radioligando a los receptores muscarínicos presentes en las preparaciones de membrana plasmática de células FRT muestran que la unión del radioligando ³H-NMS fue dependiente de temperatura, tiempo y concentración.

En todos los casos, independientemente de la concentración de ³H-NMS, la unión del radioligando al receptor aumentó progresivamente con el tiempo de incubación hasta alcanzar una unión estable a los 15 min (fig. 1), unión que luego se mantuvo estable hasta los 90 min, el tiempo máximo estudiado. La constante de disociación en situación de equilibrio (K_d), determinada a partir del cociente entre las constantes de velo-

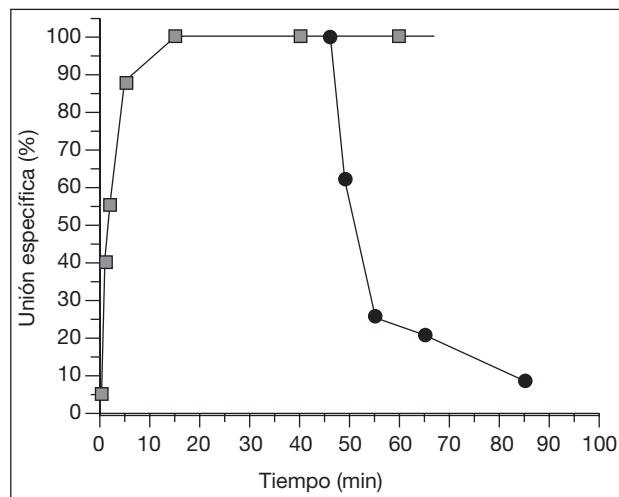


Fig. 1. Cinética de asociación y disociación de ³H-N-metil-escopolamina en membranas de células tiroideas de ratas Fisher

TABLA 2. Valores de las constantes de velocidad de asociación y disociación y constante de disociación en estado de equilibrio del ligando por su receptor

K _{on} (M ⁻¹ m ⁻¹)	5,23 E+8
K _{off} (m ⁻¹)	0,232
K _d = K _{off} / K _{on} (nmol)	0,44

K_d: constante de disociación en situación de equilibrio; K_{off}: constante de velocidad de disociación; K_{on}: constante de velocidad de asociación.

cidad de disociación (K_{off}) y de asociación (K_{on}) para este radioligando, fue de 0,44 nmol (tabla 2).

En la tabla 3 se muestran los resultados comparativos de los experimentos de competición de la unión de ³H-NMS frente a los distintos fármacos antagonistas muscarínicos utilizados: pirenzepina, AF-DX 116, himbacina, 4-DAMP, dicitolmina y HHSD. Los resultados ponen de manifiesto claras diferencias en términos de afinidad entre estos antagonistas. Así, la potencia de inhibición de la unión del ³H-NMS para los fármacos antagonistas utilizados fue: dicitolmina > HHSD = 4-DAMP > pirenzepina > himbacina = AF-DX 116. El coeficiente de Hill (nH) fue, en todos los casos, cercano a la unidad, y el análisis de los datos, con el programa LIGAND, mostró que nuestros datos experimentales se ajustaban a un modelo de un solo sitio de unión, y fue imposible realizar un ajuste de estos datos a un modelo de dos sitios de unión.

DISCUSIÓN

En cultivos primarios de células tiroideas y en células epiteliales diferenciadas de tiroides FRTL-5 la estimulación con carbacol produce importantes cambios metabólicos y funcionales que afectan, de forma directa, a la formación de hormonas tiroideas¹⁷⁻²³, lo que indica que hay receptores muscarínicos en la glándula tiroidea. Sin embargo, la naturaleza y los subtipos de receptores expresados en estas células permanecen, por el momento, poco claros. Mientras que algunos estudios indican que hay una sola población de sitios de unión en la membrana plasmática de los tirocitos, los efectuados en preparaciones de membrana plasmática de células FRTL-5 apuntan a dos lugares posibles de unión de alta y baja afinidad para la ³H-NMS, y proponen que hay dos subtipos de receptores muscarínicos según la inhibición de diferentes rutas de señalización intracelular; uno sensible a la pirenzepina, antagonista de los receptores de subtipo M₁, implicado en la activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), y otro insensible a la pirenzepina, relacionado con la disminución de la actividad fosfolipasa C (PLC)^{24,25}.

De acuerdo con el objetivo planteado, hemos efectuado una caracterización de los receptores muscarínicos presentes en células epiteliales tiroideas no diferenciadas FRT. Los resultados obtenidos indican que hay sitios de unión específicos y saturables para el ligando muscarínico ³H-NMS, y la unión del radioligan-

TABLA 3. Resultados de los experimentos y valores medios de los estudios de competición de la unión de ³H-N-metil-escopolamina (³H-NMS) frente a diversos antagonistas selectivos de los receptores muscarínicos

Antagonista		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Media ± DE
Pirenzepina	K _i (nmol)	103	66,7	121,3	97 ± 16
	nH	0,86	1,02	1,2	0,99 ± 0,13
AF-DX 116	K _i (nmol)	1.624	1.710	1.141	1.371,7 ± 172,8
	nH	0,9	1,1	0,96	0,98 ± 0,05
Himbacina	K _i (nmol)	137	159,2	107,2	134,5 ± 15,1
	nH	0,5	1,4	1,3	1,06 ± 0,28
4-DAMP	K _i (nmol)	15,2	7,6	14,6	12,5 ± 2,4
	nH	0,71	1,16	1,01	0,95 ± 0,13
Diciclomina	K _i (nmol)	2,3	5,5	1,8	3,2 ± 1,1
	nH	1,2	0,71	1,02	0,98 ± 0,14
HHSD	K _i (nmol)	5	17,1	13,4	11,8 ± 3,5
	nH	1,2	0,78	1,09	1,02 ± 0,12

AF-DX 116: 11-[[2-[(diethyl-amino)metil]-1-piperidinil]acetil]-5,11-dihidro-6H-pirido(414)benzodiazepina; 4-DAMP: 4-difenilacetoxi-N-metilpiperidina metilodida; HHSD: hexahidrosiladifenidol; K_i: constante de inhibición; nH: coeficientes de Hill.

do es dependiente de tiempo, temperatura y concentración en la membrana plasmática de células tiroideas FRT.

La constante de disociación en situación de equilibrio (K_d) guarda una estrecha correlación con los valores de K_d obtenidos en varias preparaciones de tejidos²⁶⁻²⁸ y en diferentes líneas celulares que expresan los distintos subtipos de receptores muscarínicos²⁹. Además, el número de receptores por miligramo de proteína que pueden ser marcados con ³H-NMS en la membrana plasmática de células tiroideas FRT es comparable con el encontrado en otros tejidos humanos, como la glándula submandibular y en membranas de placenta humana a término³⁰. Estos hallazgos muestran, inequívocamente, que hay receptores colinérgicos muscarínicos en la membrana plasmática de células epiteliales tiroideas FRT con una población única y muy homogénea de sitios de unión para ³H-NMS, en contra de otros trabajos²⁵.

Una vez demostrado que hay receptores muscarínicos en las preparaciones de membrana plasmática de células FRT, nos planteamos estudiar las características de la unión de diversos antagonistas selectivos en estos receptores con el fin de clarificar qué subtipo en concreto es el localizado en células epiteliales tiroideas. Para ello, realizamos experimentos de competición de la unión de ³H-NMS frente a antagonistas que muestran cierta selectividad por determinados subtipos.

La constante de inhibición (K_i) obtenida en nuestros experimentos sobre preparaciones de membrana plasmática de células tiroideas FRT con pirenzepina, un antagonista selectivo para el subtipo M₁ pero que también muestra cierta selectividad por el subtipo M₃, fue más parecida a los valores de K_i de este antagonista sobre el subtipo M₃ que para el subtipo M₁ cuando se estudia sobre tejidos de mamíferos^{31,32}, y más parecida a los valores encontrados para el subtipo M₃ que para el subtipo M₁ cuando se estudia en células transfectadas que expresan sólo este subtipo de receptor colinérgico^{29,33}. Estos hallazgos, en términos de alta afinidad para la pirenzepina, fueron concordantes con los obtenidos

cuando utilizamos como competidor otro antagonista selectivo, el AF-DX 116, un fármaco que muestra selectividad por el receptor subtipo M₂ y, en menor proporción, por el subtipo M₄ y que mostró baja afinidad para los receptores localizados en la membrana plasmática de células tiroideas epiteliales FRT. Los valores de K_i para este antagonista fueron muy similares a los encontrados³³ en líneas celulares transfectadas que expresaban solamente el receptor subtipo M₃. La existencia de una población homogénea de subtipos de receptores colinérgicos se mantiene por el coeficiente de Hill obtenido en los experimentos de competición con los antagonistas pirenzepina y AF-DX 116. Dado que estos dos antagonistas son selectivos para el subtipo M₁ y M₂ respectivamente, si la población de receptores presentes en membranas plasmáticas de células FRT no correspondiese a un solo subtipo, necesariamente deberíamos encontrar un coeficiente de Hill inferior a la unidad, cosa que no ocurrió en nuestro estudio.

Para confirmar la presencia de receptores subtipo M₃ en membrana plasmática de células tiroideas FRT, realizamos nuevos experimentos de competición de la unión del antagonista no selectivo ³H-NMS frente a los antagonistas HHSD, 4-DAMP, himbacina y diciclomina. En membrana plasmática de células tiroideas FRT, el HHSD, un antagonista moderadamente selectivo para el subtipo M₃, mostró valores de K_i más cercanos a los encontrados para los receptores subtipo M₃ que para los de subtipo M₁ cuando se expresan en líneas celulares transfectadas con un solo subtipo de receptor³³. Además, los valores de K_i determinados para el 4-DAMP en las mismas membranas estuvieron más cercanos a los valores encontrados²⁶ para el subtipo M₃ que para el M₁, mientras que la himbacina y la diciclomina²⁹ mostraron valores de K_i similares a los determinados en líneas celulares que expresan el receptor subtipo M₃. En todos los casos, los coeficientes de Hill obtenidos fueron cercanos a la unidad, lo que confirma que la unión de todos estos antagonistas se estaba realizando sobre una población homogénea y única de subtipos de receptores muscarínicos.

Del análisis pormenorizado de los resultados, podemos destacar que la información obtenida con el antagonista pirenzepina indica la exclusión del receptor subtipo M_1 como el receptor expresado en células tiroideas FRT. Los resultados derivados de nuestros experimentos con AF-DX 116 también excluyen a los receptores subtipo M_2 y M_4 como los receptores expresados en células no diferenciadas FRT; este hecho también es congruente con los resultados obtenidos con los antagonistas himbacina y dicitolmina. Además, los resultados de los experimentos con 4-DAMP y HHSD apuntan al receptor subtipo M_3 como el receptor presente en células epiteliales no diferenciadas tiroideas FRT. Todos estos resultados apoyan la propuesta de que el receptor muscarínico presente en células epiteliales no diferenciadas tiroideas FRT pertenece al subtipo M_3 .

A pesar de estos claros resultados, son necesarios nuevos estudios que evalúen el papel de la activación de los receptores muscarínicos en condiciones fisiológicas y en diferentes situaciones de enfermedad, así como el posible papel modulador de la manipulación farmacológica de dichos receptores en condiciones de hipofunción o hiperfunción tiroidea.

AGRADECIMIENTOS

Las células FRT fueron generosamente donadas por el Prof. Dr. Bruno de Jeso del Centro de Endocrinología ed Oncología Sperimentale G. Salvatore, CNR (Italia).

BIBLIOGRAFÍA

1. Van Sande J, Dumont JE, Melander A, Sundler F. Presence and influence of cholinergic nerves in the human thyroid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;51:500-2.
2. Brandi ML, Rotella CM, Tanini A, Toccafondi R, Aloj SM. Cholinergic control of cyclic nucleotide metabolism in human thyroid cells. *J Endocrinol Invest.* 1987;10:451-8.
3. Roszkowski A. An unusual type of sympathetic ganglionic stimulant. *J Pharmacol Exp Ther.* 1961;132:156-70.
4. Barlow RB, Berry KJ, Glenton PA, Nilolaou NM, Soh KS. A comparison of affinity constants for muscarine-sensitive acetylcholine receptors in guinea-pig atrial pacemaker cells at 29 degrees C and in ileum at 29 degrees C and 37 degrees C. *Br J Pharmacol.* 1976;58:613-20.
5. Hammer R, Berrie CP, Birdsall NJ, Burgen AS, Hulme EC. Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature.* 1980;283:90-2.
6. Levey AI. Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sci.* 1993;52:441-8.
7. Caulfield MP. Muscarinic receptors – characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther.* 1993;58:319-79.
8. Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 1998;50:279-90.
9. Eglén RM, Reddy H, Watson N, Challiss RA. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci.* 1994;15:114-9.
10. Wess J. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:423-50.
11. Wess J. Novel insights into muscarinic acetylcholine receptor function using gene targeting technology. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:414-20.
12. Zhang W, Yamada M, Gomez J, Basile AS, Wess J. Multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes modulate striatal dopamine release, as studied with M1-M5 muscarinic receptor knock-out mice. *J Neurosci.* 2002;22:6347-52.
13. Fernando JC, Abdallah EA, Evinger M, Forray C, El Fakahany EE. The presence of an M4 subtype muscarinic receptor in the bovine adrenal medulla revealed by mRNA and receptor binding analyses. *Eur J Pharmacol.* 1991;207:297-303.
14. Basile AS, Fedorova I, Zapata A, Liu X, Shippenberg T, Duttaroy A, et al. Deletion of the M5 muscarinic acetylcholine receptor attenuates morphine reinforcement and withdrawal but not morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:11452-7.
15. Jimenez E, Pavia J, Morell V, Martin E, Montiel M. Muscarinic receptor subtypes and calcium signaling in Fischer rat thyroid cells. *Biochem Pharmacol.* 2001;61:337-42.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
17. Rani CS, Field JB. Comparison of effects of thyrotropin, phorbol esters, norepinephrine, and carbachol on iodide organification in dog thyroid slices, follicles, and cultured cells. *Endocrinology.* 1988;122:1915-22.
18. Raspe E, Laurent E, Corvilain B, Verjans B, Erneux C, Dumont JE. Control of the intracellular Ca(2+)-concentration and the inositol phosphate accumulation in dog thyrocyte primary culture: evidence for different kinetics of Ca(2+)-phosphatidylinositol cascade activation and for involvement in the regulation of H2O2 production. *J Cell Physiol.* 1991;146:242-50.
19. Raspe E, Dumont JE. Control of the dog thyrocyte plasma membrane iodide permeability by the Ca(2+)-phosphatidylinositol and adenosine 3',5'-monophosphate cascades. *Endocrinology.* 1994;135:986-95.
20. Jimenez E, Gamez MI, Bragado MJ, Montiel M. Muscarinic activation of mitogen-activated protein kinase in rat thyroid epithelial cells. *Cell Signal.* 2002;14:665-72.
21. Montiel M, Pavia J, Marsigliante S, Jimenez E. Activation of muscarinic acetylcholine receptors induces Ca(2+) mobilization in FRT cells. *Cell Signal.* 2001;13:207-12.
22. Montiel M, Quesada J, Jimenez E. Activation of second messenger-dependent protein kinases induces muscarinic acetylcholine receptor desensitization in rat thyroid epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;223:35-41.
23. Montiel M, Quesada J, Jimenez E. Activation of calcium-dependent kinases and epidermal growth factor receptor regulate muscarinic acetylcholine receptor-mediated MAPK/ERK activation in thyroid epithelial cells. *Cell Signal.* 2007;19:2138-46.
24. Bizzarri C, Di Girolamo M, D'Orazio MC, Corda D. Evidence that a guanine nucleotide-binding protein linked to a muscarinic receptor inhibits directly phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:4889-93.
25. Di Girolamo M, D'Arcangelo D, Bizzarri C, Corda D. Muscarinic regulation of phospholipase A2 and iodide fluxes in FRTL-5 thyroid cells. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1991;125:192-200.
26. Lazareno S, Buckley NJ, Roberts FF. Characterization of muscarinic M4 binding sites in rabbit lung, chicken heart, and NG108-15 cells. *Mol Pharmacol.* 1990;38:805-15.
27. Patton WD, Rang HP. The uptake of atropine and related drugs by intestinal smooth muscle of the guinea pig in relation to acetylcholine receptors. *Proc R Soc London Ser B.* 1965;163:1-44.
28. Waelbroeck M, Tastenoy M, Camus J, Christophe J. Binding of selective antagonists to four muscarinic receptors (M1 to M4) in rat forebrain. *Mol Pharmacol.* 1990;38:267-73.

29. Dorje F, Wess J, Lambrecht G, Tacke R, Mutschler E, Brann MR. Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;256:727-33.
30. Pavia J, Munoz M, Jimenez E, Martos F, Gonzalez-Correa JA, De la Cruz JP, et al. Pharmacological characterization and distribution of muscarinic receptors in human placental syncytiotrophoblast brush-border and basal plasma membranes. *Eur J Pharmacol.* 1997;320:209-14.
31. Delmendo RE, Michel AD, Whiting RL. Affinity of muscarinic receptor antagonists for three putative muscarinic receptor binding sites. *Br J Pharmacol.* 1989;96:457-64.
32. Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley NJ. Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1990;30:633-73.
33. Buckley NJ, Bonner TI, Buckley CM, Brann MR. Antagonist binding properties of five cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Mol Pharmacol.* 1989;35:469-76.