

Erradioligandoen bidezko hartzailleekiko finkapen-teknika

Luis-Felipe Callado & Mikel-Asier Garro

Farmakologi Saila.
Medikuntza eta Odontologi Fakultatea.
UPV/EHU.48940. Leioa. Bizkaia.

Abstract

The idea that cell-surface receptors are well-designed molecular entities to which drugs, hormones or neurotransmitters bind in obedience to the law of mass action was definitively formulated 60 years ago, but in that age there weren't so sensitive techniques to measure directly the drug-receptor interactions. That is the reason because the apparition of the receptor binding technique has led to an important progress in the neuroscience research. The use of ligand-binding technique provides information about the characteristics of the neurotransmitter receptors, the different subtypes and their regional distribution in brain. So, in this article we will expose the more commonly used methods to design and perform a binding experiment.

Laburpena

Hormonak, farmakoak eta neurotransmisoreak masa-akzioaren legeari jarraituz atxikiko diren mintz hartzaillei dagokienez, ondo zehazturiko entitate molekularrak direla orain dela 60 urte frogatu zen lehenengo aldiz. Hala ere, garai hartan farmako/hartzaille elkarrekintzak neurtzeko nahikoa sentikor zen teknikarik ez zegoen existitzen. Hau dugu binding teknikak neurozientzi arloko ikerkuntzan aurrerapen garrantzitsua sortzearen arrazoia. Erradioligandoen bidezko finkapen-teknika honen bidez, neurotransmisorentzako hartzailleen ezaugarriak, azpimota desberdinak eta garunean duten eskualde-banaketari buruzko informazioa lor daiteke. Hau dela eta, binding esperimentua burutzeko diren metodo erabilienak azaltzen saiatuko gara artikulu honetan.

Sarrera

Gizaki edo animalien hormonek, neurotransmisoreek, farmakoek, eta abarrek efektua sortaraz dezaten, zeluletan dauden makromolekula berezi batzuekin elkarrekintza burutu beharra dute. Elkarrekintza horien ondorioz, zelulan hainbat prozesu kimiko

suertatuko dira, zelulan eragina sortuko dutelarik. Neurotransmisoreekin elkarrekintza duten makromolekula horiek, hartzaille izenez izendatzen ditugu. Nerbio-sistema osatzen duten neuronek ere, badituzte beren funtzioak betetzeko behar dituzten hartzailleak. Hartzaille-mota ugari dago zeluletan. Besteak beste, honako hauexek ditugu:

- 1) Mintz plasmatikokoan kokatzen diren hartzaileak (α_2 adrenozeptorea adibidez); egitura proteikoa, glukoproteikoa edo glukolipoproteikoa dutenak, alegia.
- 2) Zelula barneko zitoplasman murgilduak dauden hartzaileak (molekula esteroiden hartzaileak). Horiek egitura proteikoa izan ohi dute.
- 3) Zelularen nukleoan dauden hartzaileak (triodotironinarentzako hartzailea adibidez mota honetakoa da). Mota honetako hartzaileek ere egitura proteikoa izaten dute.

Artikulu honetan mintz plasmatikokoan dauden hartzaileei buruz arituko gara.

Hartzaileak azpiunitatez osaturik egon daitezke, azpiunitate bakoitzak bere funtzio bereziak eduki ditzakeelarik. Mintz plasmatikokoan kokaturik dauden hartzaileek adibidez (Nerbio Sistema Zentralean (NSZ-an) ugarien direnak), normalean azpiunitate desberdinak dituzte. Lehenengoak ligandoarekin bat egiteko zeregina izango luke eta bigarrenak edo besteak prozesu kimiko guztiak burutuko dituzten azpiunitateak izango lirarteke. Orain arte, hartzaileek eragiten zituzten efektuak neurtuta egiten ziren saio farmakologiko guztiak. Gaur egun, aldiz, 70.eko hamarkadan garatu zen teknika baten bidez hartzaileekin lan egitea posiblea da. Teknika horren izena, erradioligandoen bidezko finkapen-teknika da. Teknika honekin hartzaileak zenbatu eta identifikatu egin daitezke. Hartzaileen ezaugarriak ezagutzuz, hartzaile hauen eskualde-banaketa ere lor daiteke eta pairatzen duten erregulazioa ere azter daiteke. Horrela, hartzaileak ehunetan non dauden jakin daiteke.

Erradioligandoen bidezko finkapen-teknika hiru ataletan bana daiteke. Lehenbizi, ehuna edo mintzak erradioligandoarekin batera inkubazioan jartzen dira. Bigarren, soberan dagoen erradioligandoa (hartzaileekin batu ez den erradioligandoa) laginetatik banandu egin behar dugu, erreakzioa geldiaraziz. Azkenik, laginean dagoen erradioaktibitatea neurtu egingo dugu.

Hartzaileek ligandoa ezagutzea eta berarekin elkarrekintza izatea dute ezaugarri nagusia. Elkarrekintza horrek ligandoarekiko eta egitura aldetik berdintsuak diren beste molekulekiko espezifikoak izan behar du. Horrela, ligandoaren kontzentrazio baxuetan hartzailearekin lotzea lortzen da. Prozesua itzulgarria izanik jazoko da. Erradioligandoa aldi berean hartzailearekin batu eta banandu egingo da. Hartzaile-kopurua mugatua denez, prozesuak asegarria edo betegarria izan beharko du. Teknika horren bidez ikertzen ditugun hartzaileak, efektu farmakologikoak erabiltzen dituzten tekniken bidez ere aztertu beharko dira.

Molekula berbera hartzaile desberdinekin elkarrekintza izan dezake hainbat kasutan. Noradrenalinak, adibidez α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , hartzaileekin elkarrekintza izaten du. Beraz, noradrenalina hartzaile desberdinekiko ez da batere selektiboa. Ligandoa selektiboagoa izan dadin, ahalik eta hartzaile gutxienekin izan beharko du elkarrekintza. Garrantzitsua dugu oso teknika horretan gure ligandoa selektiboa izatea. Bestela ezingo da jakin hartzaile konkretu bat markatzen ari den edo markaketa hori hartzaile askorekiko loturaren frutu den.

Erradioligandoen finkapen-teknikaren ezaugarriak

Hartzaile-populazioetan lortzen den ligandoaren finkapena segurua izan dadin, prozesuak zenbait ezaugarri bete behar du.

A.) *Finkapena hartzaile-mota batekin espezifikoak izan dadin erradioligandoak bete behar dituen baldintzak.*

A.1. Ligandoak agonista edo antagonista moduan iharduera biologikoa eduki behar du.

A.2. Erradioligandoak iharduera espezifiko altua eduki behar du. Hartzaile-kopurua txikia denez, molekula edo ligandoak erradioaktibitate altua, 5 Ci/mmol gutxienez, eduki beharko du.

- A.3. Ligandoak afinitate altua izan beharko du. Horrela, ligando-kontzentrazio baxuaz hartzailearekin bat egingo du.
- A.4. Ligandoak hartzaile-mota horrekiko selektiboa izan behar du; ez du beste hartzaileekin elkarrekintzarik izan behar.
- A.5. Ligandoaren banaketa-konstanteak baxua izan behar du.
- A.6. Erradioligandoak egonkorra izan behar du.

B.) Finkapenaren prozesua espezifikoa izan dadin bete behar diren baldintzak.

- B.1. Hartzaile-kopuru konkretua dagoenez, finkapen-prozesuak asegarria edo bete-garria izan behar du.
- B.2. Afinitate altuko prozesua izango da.
- B.3. Erabiltzen diren ligando-kontzentrazioek biologikoki erantzunak sortarazteko modukoak izan behar dute.

Esperimentuaren diseinua

Atal honetan erradioligandoen finkapen-tek-nikan erabiltzen deneko metodologiari buruz arituko gara.

A) Erradioligandoaren hautaketa.

Lehenik, ikertu nahi dugun hartzailearekiko ligando aproposena aukeratu beharko da. Ligandoa aukeratzeko erabiltzen diren irizpi-deak aurreko atalean azaldu dira. Ligandoa aukeratu eta gero, erradioaktibo bihurtu beharko da. Normalean, zuzeneko sintesi edo ordezkate-prozesuaren bidez ligandoaren egitura molekularrean dauden hidrogenoen tritiatzearekin batera (^3H) lortzen da ligandoa erradioaktibo bihurtzea. Tritioa erabiltzeak dituen abantailak honako hauexek ditugu.

- 1) Markatutako ligandoa eta tritiorik ez duena (ligando hotza) iharduera biologikoaren aldetik berdinak dira; tritiatze-prozesuak ligando hotzean ez baitu kalte handirik egiten.
- 2) Lor dezakegun erradioaktibitatea, normalean altua izaten da (30-100 Ci/mmol).

- 3) Ligando tritiatuak hilabete askotan zehar egonkor mantentzen dira.
- 4) Tritioaren desintegrazio-periodoa oso luzea da (12 urte gutxi gora-behera).

Tritioa erabiltzeak, aldiz, ekoizpen-prozesuan espezializaturiko etxe komertzialetan erradioligandoa erostea esan nahi du; ^3H -a daramaten erradioligandoak ekoiztea ez baita gauza erraza. Horrela, esperimenduak garestitu egiten dira oso.

Tritioaz aparte, badira ligandoak erradioaktibo bihurtzeko beste atomo batzuk ere; I^{125} adibidez. Iodinazio-prozesua laborategian bertan egin daiteke. I^{125} -ak tritioarekiko dituen abantailen artean, erradioaktitate-maila tritioa baino askoz altuagoa (2000 Ci/mmol) izatea da bat. Iodinazio-prozesua merkea dela ere kontutan hartzekoa da. Desabantailen artean, aldiz, iodinazio-prozesuak ligandoaren egitura molekularra kaltetu edo apur dezakeela esan behar da, ligandoak duen iharduera biologikoa eralda daitekeelarik. Bestalde, I^{125} -aren desintegrazio-periodoa laburra da (2 hilabete inguru). Beraz, iodinazio-prozesua maiz burutu beharko da erradioligandoa iodinatua erabili nahi baldin bada.

B) Buffer-aren hautaketa

Bufferra, erradioligando eta hartzaileen arteko erreakzioa burutzen deneko inguru likidoa besterik ez da. Inguru horrek konposizio kimiko zehatza eduki beharko du; buffer horren konposizio kimikoak erabateko garrantzia baitauka erreakzioaren martxa ona izan dadin. Bufferra osatzen duten ioi edo nukleotido bakoitza eta beren kontzentrazioa, erreakzioa baldintza egokienetan gerta dadin pentsatuta ipini dira. Konposizio horren edozein aldaketa, esperimenduaren bukaeran lortuko ditugun datuetan nabarmenduko da. Adibide gisa gure bufferrean GTP-a ezartzen bada, normalean agonistak hartzaileekiko duen afinitatea jaitziarazi egingo du, bifasikoa litzatekeen lehiaketa-kurba monofasiko bihurtuko lukeelarik. Dena den, bufferraren konposizio kimikoa aldatzea ez da komeni,

aldaketaren efektu espezifikoa bilatzen ez badugu behintzat.

C) Mintzen prestakuntza

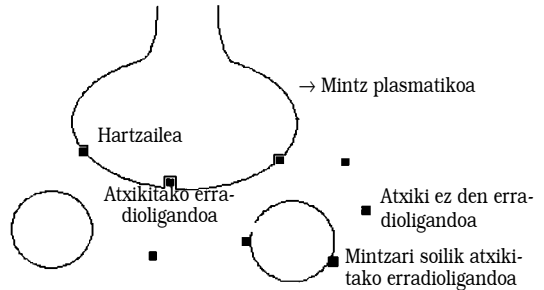
Ikertu nahi diren hartzaileak zelularen leku konkretuan kokaturik daudenez, esperimentua burutzeko zelularen atal hori besterik ez da behar. Beraz, atal zelular hori isolatu egin behar da.

Lehenik, ehuna txikiagotu egingo da, osatzen dituen zelulak apurtu egingo direlarik. Txikiagotze prozesua burutu eta gero, zentrifugazioaren bidez (3.000 x g) interesatzen zaigun atal zelularra hartuko dugu, nahi ez ditugun beste atal zelular guztiak deuseztuz. Lehenengo zentrifugazioan nukleo edo antzerako tamaina duten organulu zelularrak deuseztuko ditugu. Abiadura altuagoko (40.000 x g) bigarren zentrifugazioan mintza eta antzeko tamainako entitateak hondoratuko dira. Horrela, geratzen den pellet-a birhomogenotu eta berriro zentrifugatu egingo da. Horren bidez, esperimentua oztopa dezaketen neurotransmisore eta nukleotido endogenoak (GTP-a, adibidez) deuseztatuko dira.

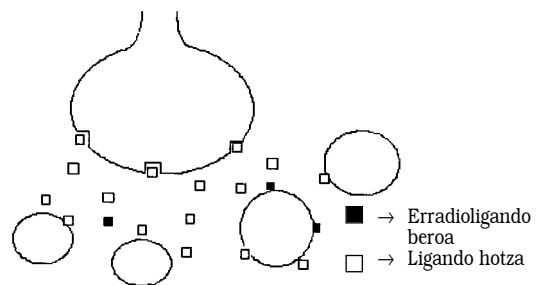
D) Inkubazioa

Erradioligandoa, prestaturik dauden mintz zelularrekin batera jartzen da, baldintza eta denbora egokietan utziko direlarik. Inkubazio hori erradioligandoaren eta hartzaileen arteko finkapen- eta banaketa-prozesuen erlazioak oreka lortu arte burutzen da. Hartzaile eta erradioligando-mota bakoitzak pH-a, tenperatura eta inkubazio-denbora ezberdinak behar izaten ditu oreka horretara iristeko. Baldintza esperimental horiek zehazteko helburuaz esperimentu zinetikoak burutuko dira. Denbora horretan erradioligandoa hartzaile eta hartzaile ez diren lekuekin ere lotu egingo da. Finkapen espezifikoa hartzaileekin lotuko den erradioligando-kantitatea izango da. Finkapen inespezifikoa, aldiz, beste egituretara lotuko den gainerako erradioligando guztia izango da. Esperimentuaren finkapen inespezifikoa zehazteko, erradioligandoa baino 1.000-

A totala



B inespezifikoa



1. irudia. Erabiltzen den erradioligandoa hartzaile eta entitate ezberdinetara lotzen denez, guztiz beharrezkoa da lotura inespezifikoa zein den zehaztea. Irudiaren A atalak, erradioligandoa bai hartzaile eta bai laginean dauden beste entitateetara (mintzera adibidez) ere lotzen dela adierazten du. B atalean, aldiz, erradioligandoa baino 1.000-10.000 aldiz kontzentratuago dagoen ligando hotzak hartzaile guztiak betetzen dituela adierazten du, azken baldintza hauetan erradioligandoa hartzaile ez diren beste entitateekin lotuko delarik. Horrela, bigarren atal honek emango duen erradioaktibitate-maila inespezifikoari dagokion finkapena adieraziko du.

-10.000 aldiz kontzentratuagoa dagoen ligando hotza (erradioaktibitate ez duena) gehituko da (Ikusi 1. irudia). Horrela, hartzaile guztiak ligando hotzez beteta izango dira, gelditzen den erradioaktibitatea beste egituretara lotu den erradioligandoaren neurketaren adierazpena izango delarik. Bestalde, beste

lagin batzuetan hartzaileetara eta beste egituratar lotu izan den erradioaktibitatea neurtuko da, finkapen totalari dagokion neurketa izango delarik. Totalari inespezifikoa kenduz gero, interesatzen zaigun finkapen espezifikoa lortuko da.

E) Erreakzioaren geldiarazte-prozesua

Inkubazioa burutu eta gero, prozesua geldierazteko eta laginean aske dirauen erradioligandoa ezabatzeke erabiltzen diren teknikak iragazketa, zentrifugazioa, dialisi-oreka, gelaren bidezko iragazketa kromatografikoa, etab. dira. Hauetatik, lehenengo bi teknikak aztertuko dira segidan. Teknika hauek ahalik eta azkarren burutu behar dira. Horrela ez bada hartzaile/erradioligando konplexua prozesuaren geldiarazte-prozesu horretan banandu egingo da, laginean dagoen hartzaile-kopuruaren neurketak baliogetuz.

E.1.) Iragazketa

Teknika honetan, erradioligandoaren eta hartzaileen arteko erreakzioa geldiaerazteko asmoz laginak dauden hodietara hotza dagoen bufferra ugari gehituko da, guztia iragazpaperetik pasaraziko delarik. Prozesu hau burutu ondoren, hodi bakoitzari dagokion iragazpaperari erradioaktibitatea neurtzeko behar den izarniadur likidua gehituko diogu. Lagin bakoitzak duen erradioaktibitate-maila neurtzeko "kontadore" edo erradioaktibitatea neurtzeko balio duen aparatuan sartuko da.

Iragazketa-teknika honek dituen abantailetan azkarra izatea bat da. Bestalde, iragazpaperaren ere finkapen inespezifikoa eduki dezakegunez, hori saihesteko iragazpapera erabili baino lehen antizurgatzailea den polietilennimazko bainuan hezatu egiten da. Horrela, erradioligandoak beirazko zuntzekiko duen finkapen inespezifikoa murriztu egingo da.

E. 2.) Zentrifugazio-teknika

Hartzaile/erradioligando konplexuaren banatze-prozesua oso azkarra denean edo eta erra-

dioligandoak iragazpaperaren osagaiekiko duen finkapen inespezifikoa oso altua eta murriztu ezina bada, zentrifugazioa erabili genezake iragazketa-teknikaren alternatiba moduan.

Teknika honek duen akats garrantzitsuenak zentrifugazioaren ondoren hartzaileei atxikita ez dagoen erradioligandoa bahituta geratu ahal izatea da, honek finkapen inespezifikoa handiagotu egingo duelarik.

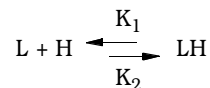
Datuen prozesaketa

Teknika honen bidez lortuko diren parametro garrantzitsuenak K_D -a eta B_{max} -a dira. Hauek kalkulatu ahal izateko, datuetan zenbait eraldaketa matematiko egitea beharrezkoa da. Oraintsu arte, eraldaketa matematiko hauek eskuz egin izan dira. Gaur egun, aldiz, ordenadoreen aurrerapena dela eta, badira datu hauek prozesatzeko programa informatikoak.

1. Eskuz eginiko datu-prozesaketa.

Datuak eskuz edo kalkulagailuz prozesatzeko behar diren formula matematikoak.

Ligandoa eta hartzailea orekan daudenean, orokorki formula honi darraie.



L = Ligandoa

H = Hartzailea

LH = Ligando/Hartzaile konplexua.

K_1 eta K_2 konplexuaren eraketa eta deusezpeneko abiadura-konstanteak dira.

$$|L| |H| K_1 = |LH| K_2$$

$$\frac{|L| |H|}{|LH|} = \frac{K_2}{K_1} = K_D$$

K_D -a orekan dagoen disoziazio-konstantea da.

Hartzaile-kopuruaren erdia erradioligandoz beterik daudenean

$$|H| = |LH|$$

$$\text{Beraz, } K_D = |L|$$

$|H_t| = |H| + |LH|$ goiko formularen aplikatuz gero.

$$|H_t| |L| - |LH| |L| = K_D |LH|$$

$$|H_t| |L| = |LH| (K_D + |L|)$$

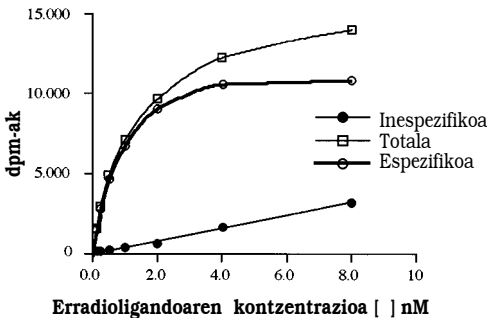
Beraz:

$$\frac{|LH|}{|H_t|} = \frac{|L|}{|L| + K_D}$$

Formula hauetatik lor dezakegun informazioa honako hau da: hartzaileen erdia betetzeko behar den erradioligando-kontzentrazioa eta K_D -a berdinak dira. K_D -aren aldeantzia afinitatea denez, afinitatea ezagutu dezakegu.

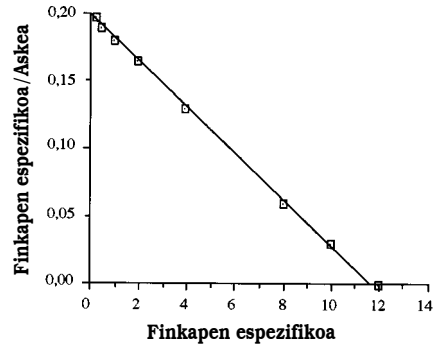
$$|LH| = B \text{ eta } |LH| + |H| = B_{\max}$$

Saturazio-esperimentua



2. irudia. Saturazio-esperimentuan finkapen inespezifikoa hazkunde lineala duen marra zuzena den bitartean, finkapen totala kurba-itxura duen marrari dagokio. Finkapen espezi-fikoak, aldiz, totalari dagokion kurbari finkapen inespezifikoaren marra zuzena kenduz gero, hiperbola errektangularraren itxura duen aurkezpen grafikoa sortarazten du.

Scatchar-a



3. irudia. "Scatchard" izeneko eraldaketa matematikoaren bidez, K_D -a (marra zuzenaren malda) eta B_{\max} -a parametroak, marra zuzenak abzisa-ardatzarekin duen gurutzaketa-gunetik atera ditzakegu.

deitzen baditugu, aurreko formula honela gel-ditzen zaigu:

$|F| = \text{Estandarra} - \text{Totala}$ (ingelesez free edo askea deitzen da. Beraz batu ez den erradioligandoa).

$$|B| = \frac{B_{\max} |L|}{K_D + |L|}$$

K_D -a eta B_{\max} -a kalkulatzeko errazagoa izan dadin, Scatchard izeneko aurkezpen grafikora jotzen da.

$$\frac{|B|}{|F|} = \frac{-|B|}{|K_D|} + \frac{B_{\max}}{|K_D|}$$

$$|B| / |F| \text{ vs } |B|$$

2. Datuen analisi informatikoa

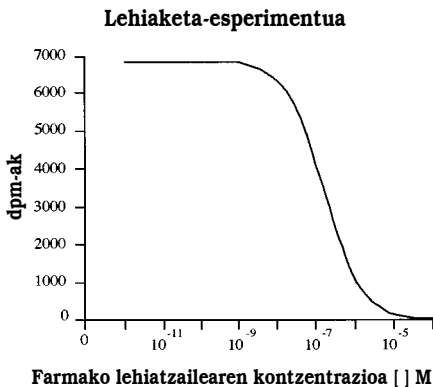
Merkatuan dauden programa informatikoetatik EBDA eta LIGAND izeneko programak erabiltzen ditugu gure laborategian. Beraz, hauek izango dira (beste asko egon arren)

hemen aipatuko ditugun programa informatiko bakarrak. Kontadoretik lortutako erradioaktibitate-mailen datuek EBDA izeneko programa informatikoaren bidez lehenengo prozesaketa jasango dute. Lehenengo azterketa honen bidez K_D -a eta B_{max} -a parametroen balioen hurbilketak lortuko dira. LIGAND programak, aldiz, hurbilketa horiek erabiliz lineala ez den analisisien bidez parametro horien balio zehatzak emango ditu.

Esperimentu-motak

1.- Saturazio-esperimentua

Saturazio-esperimentuan ligando erradioaktiboaren kontzentrazio desberdinak hartzaileak daudeneko laginarekin bat ezartzen dira. Horrela, ligando-kontzentrazio baxuarekin hartzaile gutxi markatuko dira. Ligandoaren kontzentrazioak gora doazen neurrian hartzaile-kopuru altuagoa markatuko da. Hala ere, ligando-kontzentrazio batetik aurrera ezingo da hartzaile gehiago markatu. Esperi-



4. irudia. Lehiaketa-esperimentuaren grafiko honetan dakusagunez, farmako lehiatzailearen kontzentrazioa gora doan neurrian, hartzaileekin finkatu den erradioligandoa (eta beraz neurtzen dugun erradioaktibitatea (dpm-ak)) beherantz doa; farmako lehiatzaileak hartzaile gehienak betetzen baititu.

mentu honekin, beraz, hartzaile-kopuru maximoa (B_{max}) eta ligandoaren afinitatea ezagutu ditzakegu. Afinitatea K_D parametroaren inbertsoaren bidez ezaguna dugu. Konstante horiek "Scatchard" izeneko eraldaketa matematikoaren bidez jakin ditzakegu (Ikusi 2. eta 3. irudia).

2.- Zinetikazko esperimentua


Zinetikazko esperimentuaren bidez farmakoaren eta hartzaileen arteko batura egiteko baldintza esperimental egokienak zein diren jakitea lortuko da.

3.- Lehiaketa-esperimentua

Lehiaketa-esperimentuan, erradioaktibitatea duen ligandoaren kontzentrazioa bakarra da. Azken honekin lehia egingo dutenen kontzentrazioak, aldiz, ugariak dira eta era gorakorrean jarriko dira. Ligando hotzak (erradioaktibitatearik ez duenak), beroarekin (erradioaktibitatea duenarekiko) lehia egiten duenez, hotzaren kontzentrazioa igotzen den neurrian, gero eta ligando bero gutxiago aurkituko dugu hartzaileei atxikia. Datu hauen aurkezpen grafikoa eginez gero, 4. irudiaren moduko grafikoa emango du. Lehiaketa esperimentu hauen bidez, hartzaile batekik farmako berrien fixapena espezifikoa den ala ez jakin daiteke. Esperimento horietan lortzen den afinitateaz baliatuz, farmakoaren potentzia ezagutu daiteke. Hartzaile desberdinen mota berri ezezagunak identifikatzea ere lor daiteke, farmako desberdinen potentzia (kasu honetan K_i -ren bidez ezagututakoa) ikusiz.

Teknika honek dituen aplikazioak

Alde batetik, lehen aipatu dugun teknika horren bidez hartzaileak zenba daitezke, bai egoera normalean eta bai egoera patologikoe-tan. Honekin lotuta, hainbat gaixotasunetan egoera normalarekiko dauden eraldaketak ikusiz, medikuak tratamendu farmakologikoak erabili dituzte, aldaketa horiek zuzentzeko

asmoz. Horrela, hainbat gaixotasunetan, Parkinson-aren kasuan adibidez, nahiz eta erabat sendatu ez, gaixotasunak eragiten dituen sintomak murriztea lortu da. Bestetik, hartzaileek gorputzeko eremuetan banaketa eta kopuruaren erlazio desberdina dute. Hau dela eta, gorputzeko funtzioak hartzaileekiko erlazioa daitezke, zenbait kasutan, funtzio konkretu bat hartzaile-mota baten bidez azal daitekeelarik. Hirugarren aplikazio moduan teknika horren bidez hartzaile-azpimota berriak identifika daitezke. Azkenik, sintetizatuturiko farmako berrien "screening" edo bere ezaugarri farmakologikoen azterketa egiteko teknika hau guztiz aproposa dugu. 

Bibliografia

- (1) YAMAMURA, H.I., ENNA, S.J. & KUCHAR, M.J. (editoreak); "Neuro-transmitter receptor binding", bigarren edizioa, 61-91; Raven Press, New York 1985.
- (2) BYLUND, D.B. & YAMAMURA, H.I.; "Methods for receptor binding"; in Methods in neurotransmitter receptor analysis; Raven Press, New York. 1-35, (1990).
- (3) HULME, E.C. editorea; "Receptor-ligand interactions. A practical approach", lehenengo edizioa; Oxford University Press. Oxford, 1992.