

Determinación de niveles séricos de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) durante la gestación de la yegua por Radioinmunoanálisis (RIA)

Lanzzeri, S¹.; Martínez, E.B¹.; Gama, S¹.

RESUMEN

El objetivo del trabajo es realizar la cuantificación de los niveles de gonadotropina coriónica equina (eCG) a lo largo de la preñez de la yegua utilizando la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) con anticuerpos altamente específicos. Se eligen 5 yeguas Pura Sangre de Carrera, de tres años de edad, con preñez confirmada por ecografía. Se extraen muestras de sangre semanalmente desde el día 0 al 120 del celo y una vez por mes hasta el fin de la gestación. Para determinar los niveles basales se extraen muestras a hembras vacías y machos. Para el RIA de eCG se emplea un anticuerpo policlonal de conejo altamente específico, eCG marcada con ¹²⁵I por el método de cloramina-T limitante con 60±17% de rendimiento. Se obtienen curvas con dosis mínimas detectables de 8.4±2.5 ng/mL, curvas dosis-respuesta con pendientes de 0.9± 0.3 y 100±32ng/mL de dosis 50%. Los niveles basales en machos y hembras vacías fueron 148±88 ng/mL. En hembras preñadas los niveles aumentaron a partir de los 35 días alcanzando un máximo a los 50 días para retornar a niveles basales a partir de los 150 días. En conclusión se cuenta con un procedimiento altamente sensible y específico para la determinación de los niveles séricos de eCG en la preñez equina.

Palabras Clave: eCG, Gonadotropina coriónica, gestación, radioinmunoanálisis, preñez equina.

SUMMARY

The objective is to quantitate levels of equine chorionic gonadotropin (eCG) along the pregnancy of mare employing a radioimmunoassay technique (RIA) developed with highly specific antibodies. Five race mares were chosen, three years old with pregnancies confirmed by echography. Blood samples were collected from venipuncture of the neck vein at weekly intervals between 0 (estrous) and 120 days and monthly afterwards until parturition. Blood samples from empty mares as well as males were collected following the same procedure. A polyclonal antibody raised in rabbits highly specific for eCG was used for the radioimmunoassay. eCG labelled with ¹²⁵I was produced by limiting chloramine-T method with 60±17% yield. Calibration curves with minimum detectable doses of 8.4±2.5 ng/mL, slopes of 0.9± 0.3 and dose equivalent to 50% binding (ED_{50%}) of 100±32ng/mL. Serum levels of eCG in male as well as empty mare were 148±88 ng/mL. Pregnant mares eCG blood levels increased from the day 35 reaching a maximum at 50 days and reaching ground levels at approximately 150 days.

In conclusion a highly sensitive and specific procedure is described for the determination of serum levels of eCG along the mare's pregnancy.

Keywords: eCG, chorionic gonadotropin, equine pregnancy, radioimmunoassay.

INTRODUCCIÓN

La gonadotropina coriónica equina (eCG equine chorionic gonadotropin) o gonadotropina del suero de yegua preñada (PMSG, pregnant mare serum gonadotropin) es una hormona de peso molecular 68000 de naturaleza glicoproteína producida por células trofoblásticas especializadas que invaden el endometrio materno para dar origen a las copas endometriales (1) (11)

Niveles de eCG en suero comienzan a ser detectados entre los 32 y 40 días del comienzo de la gestación de la yegua (13) cuando están en proceso de formación las copas endometriales (2) (8).

Hacia los 80 días la concentración de eCG alcanza su pico máximo, asociado ésto con cambios regresivos en dichas copas seguido de un retorno a niveles basales alrededor de los días 140 a 200 en los cuales esas estructuras comienzan un proceso degenerativo lo que estaría determinado por una respuesta inmunológica materna (1) no existiendo mecanismos hormonales de retroregulación (9). La evolución del desarrollo de esa estructura endometrial especializada coincide entonces con los niveles de eCG detectados en sangre (4). La función de la eCG, como plantean algunos autores, es estimular el desarrollo folicular pro-

duciendo múltiples ovulaciones con formación de cuerpos lúteos que mantienen la gestación. Otros afirman que la eCG no es reconocida por los receptores de la FSH de la yegua, por lo tanto su acción sería solamente como hormona luteotrófica (15). Existen múltiples factores que determinan los niveles hormonales producidos por cada animal. Entre ellos destacamos la influencia del genotipo materno así como de la etapa de gestación. Varios autores sostienen que también hay una influencia de la raza de la yegua (3) así como de la cantidad de veces que haya gestado previamente (13).

Recibido: 2/10/00 Aprobado: 07/05/01

¹ Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Matajojo 2055 (598 2 525 08 00), e-mail: stellal@cin1.cin.edu.uy

Algunos investigadores observaron que si la yegua concebía en el primer celo post parto los niveles eran superiores a las que concebían en celos posteriores.

El genotipo fetal incide sobre la secreción de eCG. También se demostró una mayor producción en los niveles hormonales de yeguas que cursan preñeces múltiples.

La eCG, obtenida a través de un proceso de extracción y purificación, a partir de suero de yeguas preñadas, es utilizada en programas de superovulación en las diferentes especies domésticas (12), como bovinos y ovinos (14) e inducción de celo en ovinos (7) y demás especies, debido a su capacidad de exhibir respuesta LH y FSH (9). Presenta la ventaja de su bajo costo de obtención, purificación y la de su vida media larga, la cual nos permite lograr el efecto deseado con una única dosis, facilitando así el manejo de su administración.

Teniendo en cuenta la múltiples aplicaciones de la eCG, en la optimización del manejo reproductivo de diferentes especies y considerando las variaciones individuales, genéticamente determinadas que presenta en forma individual cada yegua productora de eCG, destacamos la importancia de poder contar con una herramienta útil al momento de seleccionar hembras donantes con un nivel mayor de hormona circulante, lo que determinaría un mayor rendimiento en la etapa de extracción.

El objetivo del presente trabajo es poner a punto una técnica mediante la cual se pueda cuantificar valores de eCG en suero de yeguas preñadas por radioinmunoanálisis (RIA). En nuestro país no hay antecedentes de la valoración de la eCG por esta técnica. Se han empleado procedimientos de neutralización del antígeno por administración en ratas del anticuerpo específico (16). El RIA es una metodología que ha aportado muchos datos al momento de cuantificar tanto sustancias fisiológicas como medicamentos, en diferentes fluidos biológicos. (5),(6),(17).

Consiste en la competencia entre una molécula marcada (trazador) y otra no marcada (analito) por los limitados sitios de unión de un reactivo específico (el anticuerpo). Una vez alcanzado el

equilibrio el porcentaje del trazador unido al anticuerpo específico es inversamente proporcional a la cantidad de analito presente. Este procedimiento, debe cumplir los requisitos de exactitud, precisión, sensibilidad y reproducibilidad para que tenga validez el resultado que obtengamos de él. Como el orden de sensibilidad con que trabajamos es de picogramos es necesario extremar controles de calidad internos y externos para obtener resultados confiables.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de suero analizadas se obtuvieron de una población de 5 yeguas Pura Sangre de Carrera (PSC), de tres años de edad provenientes de un haras del departamento de Canelones. Se extrajeron muestras de sangre por punción yugular a intervalos post servicio, semanales entre 0 y 120 días y mensuales desde ese tiempo hasta el final de la gestación. Además se realizaron extracciones en hembras no servidas así como machos para control negativo de gestación y control de reacción cruzada con gonadotropinas hipofisarias respectivamente. Las gestaciones fueron diagnosticadas por ecografía.

Para el desarrollo del RIA se realizaron marcaciones de eCG² con ¹²⁵I de alta concentración de actividad, libre de portador y de agentes reductores mediante la técnica de cloramina-T limitante. Se dispensaron 5 µg de eCG en un vial de fondo cónico de polietileno de 1.5mL de capacidad con 10 µL de solución reguladora de fosfatos 0.5M pH 7.4.

Se midieron en un calibrador de dosis³ 500 µCi de ¹²⁵I en 1 a 5 µL de volumen. Se adicionó un volumen de 10 µL de cloramina-T diluida en el momento, a partir de una solución madre de 30 mg/mL, recientemente preparada. Se dejó reaccionar durante 1 minuto con agitación continua evitando la formación de espuma.

El rendimiento de marcación se evaluó mediante una prueba rápida e inespecífica de precipitación de una pequeña alícuota de la proteína marcada diluida en 100 µL de albúmina 5% con 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. El precipitado se separó por centrifugación a 3000 rpm durante 3 a 5 minutos y se midió en un contador gamma de pozo.

Finalizada la marcación se procedió a la purificación de la proteína marcada mediante filtración por columna de Sephadex G-25 equilibrado con un buffer con proteínas. Las fracciones correspondientes a la eCG marcada fueron colectadas y fraccionadas en la dilución de trabajo. Las mismas se conservaron durante 5 a 7 semanas a -20°C.

Para el análisis se emplearon anticuerpos policlonales de conejo anti-eCG específicos. Se prepararon estándares de diferentes concentraciones de eCG² (9.8-19.6- 39.2- 78.9- 156.8- 312.5- 625-1250- 2500 ng/mL) en una matriz de suero equino macho, libre de la hormona, para ser utilizada como curva de calibración. Como segundo anticuerpo se usó una inmunoglobulina de oveja anti-IgG de conejo (desarrollado por los autores) con una pequeña concentración de suero normal de conejo.

Se desarrolló el siguiente procedimiento de RIA:

En tubos de poliestireno de 12x75 mm transparentes previamente numerados y por duplicado se dispensaron 50µL de estándares o muestra, luego se adicionaron 100µL de primer anticuerpo de conejo anti-eCG diluido 1/5000. Se homogeneizó el contenido y se incubaron los tubos durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de ese período se agregaron 100 µL de eCG-¹²⁵I y se dejó incubando por 18 horas a temperatura ambiente.

La separación de la fracción unida al anticuerpo se realizó con agregado de 100µL de una mezcla de anticuerpo anti-IgG de conejo, diluido al 1/5 con 0.3% de suero normal de conejo.

Se realizó una nueva incubación de 2 horas a temperatura ambiente seguida de la incorporación de 500µL de polietilenglicol al 8%. Se incuban los tubos 30 minutos a 4°C y se centrifuga durante 30 minutos a 4°C a 3000rpm.

Se aspira el sobrenadante y se dejan los tubos invertidos por 10 minutos. Se mide el precipitado en un contador⁴ durante 1 minuto.

¹SIGMAR

² CalbiochemR

³ (PICKER, USA)

⁴SIGMAR

RESULTADOS

Se efectuaron nueve marcaciones de eCG³ con ¹²⁵I⁵ con rendimientos de 60±17%, actividades específicas de 137±87 MBq/nmol y una incorporación de ¹²⁵I de 1.0±0.3 átomos de yodo por molécula de eCG.

La Gráfica 1 muestra una curva de calibración normal del radioinmunoanálisis en donde en ordenadas se representa la respuesta de % de actividad unida al anticuerpo sobre el total de actividad del cada tubo y en abscisas se representa la potencia declarada de eCG en el calibrador expresada en ng/mL. En el mismo gráfico se representa una curva de varias diluciones de una muestra de eCG de una yegua preñada preparada en buffer con BSA al 1% y otra preparada en suero equino libre de eCG (macho) a fin de estimar las condiciones de matriz en las que el estándar presenta mayor paralelismo con las muestras a analizar. Se obtuvieron curvas con dosis mínimas detectables (DMD) de 8.4±2.5 ng/mL, rangos analíticos de 40-240ng/mL con incertidumbres inferiores al 10%, pendiente de la curva dosis-respuesta de valor 0.9 ± 0.3 en el intervalo de 9 a 2500 ng/mL, dosis 50% (D_{50%}) de 100±32ng/mL. (10)

La Gráfica 2 muestra los CV% de la curva dosis-respuesta en donde, en ordenadas se representa la incertidumbre porcentual propia del análisis y en abscisas el logaritmo natural de la concentración de eCG en todo el intervalo de validez del análisis.

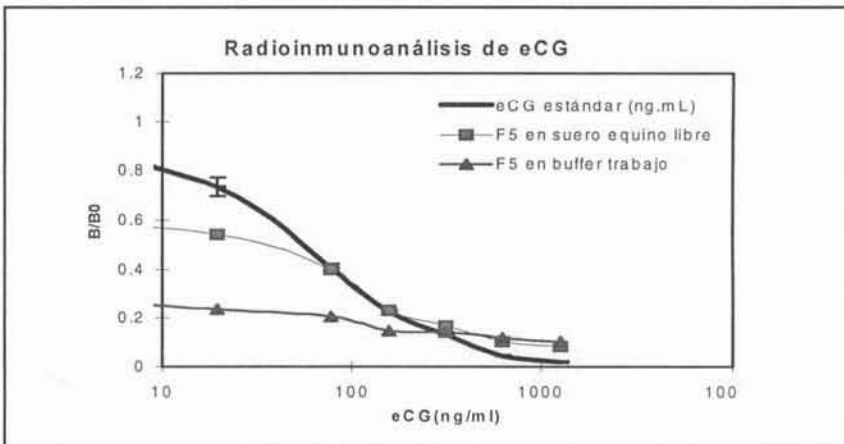
La Gráfica 3 muestra las curvas de preñez normal típicas de eCG en ng/ml en función del tiempo post servicio, en días, para la población seleccionada, mostrando un máximo del orden de 40000ng/mL a los 80 días en una de las curvas.

En forma simultánea, la valoración de una yegua no gestada dio un nivel promedio basal de 148±88ng/ml. Se alcanzaron niveles de 25800±15000ng/ml en el valor máximo de respuesta a los 68±17 días con un inicio de la descarga de eCG a los 52±17 días y retornando a niveles basales en el entorno de los 181±31 días.

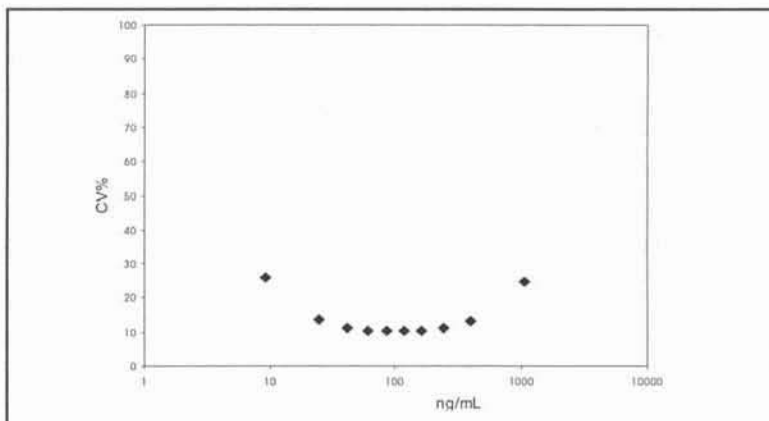
La Gráfica 4 muestra la variabilidad de eCG en diferentes períodos de tiempo

³ CIS, Francia

⁵ COMPAC 120 (PICKER, USA).



Gráfica 1. Representa una curva estándar del radioinmunoanálisis de eCG con un estándar de Sigma de referencia preparado en una matriz de suero equino macho y niveles de concentración acordes con los de las muestras a analizar. Además se representa en el mismo plano una dilución de suero de yegua preñada desde ½ hasta 1/100 a fin de verificar las mejores condiciones de paralelismo entre el estándar y las muestras problema. Las diluciones se efectuaron en suero equino macho y en buffer fosfato salino con seroalbúmina bovina.

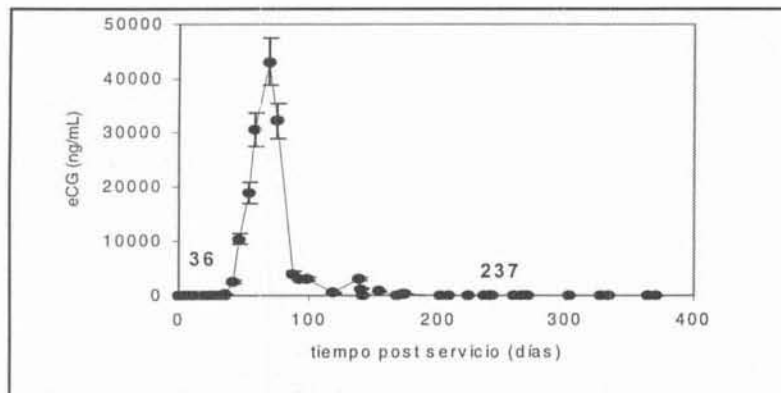


Gráfica 2. Muestra los CV% promedios donde en ordenadas se representa la incertidumbre porcentual propia del análisis y en abscisas el logaritmo natural de la concentración de eCG en todo el intervalo de validez del análisis.

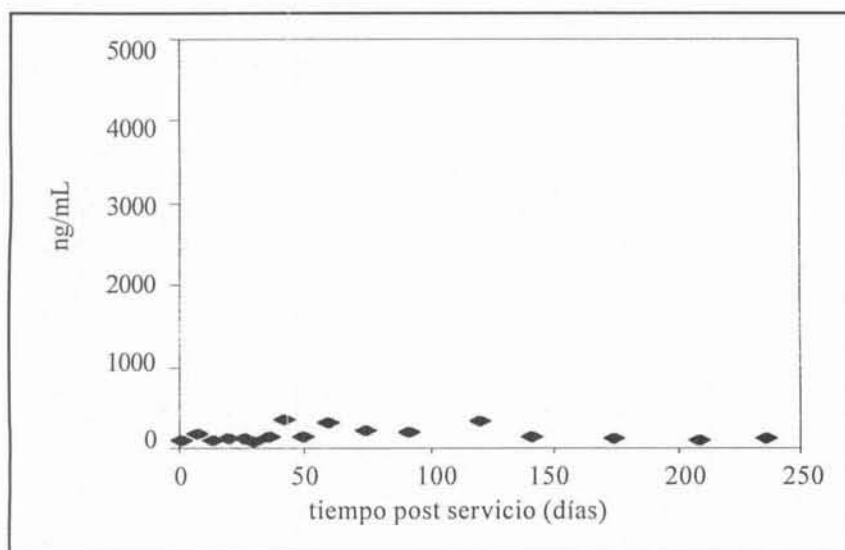
de una yegua sin preñez, con valores promedios basales de 148±88ng/ml. La gráfica representa los niveles de eCG en ng/mL en función del tiempo en días. Considerando una respuesta del orden de 20000 ng/mL el porcentaje expresado en la gráfica representa aproximadamente un 0.5% de una respuesta positiva típica ($p < 0.00005$).

La Gráfica 5 muestra una curva de niveles hormonales en una yegua con comportamiento diferente del resto de la población. Luego de varios servicios efec-

tuados a los 2, 16 y 21 días del celo, con gestación confirmada por ecografía, esto no se correspondió con niveles típicos o característicos de eCG en la preñez. A partir de 80 días se observa una caída de los niveles de eCG probablemente debido a una muerte embrionaria. Luego de una segunda serie de servicios a los 296, 298 y 301 días con referencia al primer celo, se confirma por ecografía, la ausencia de gestación, acompañada por valores bajos de eCG. Se llevan a cabo nuevos servicios que terminan a los 329 días



Gráfica 3. Muestra la curva típica de eCG en ng/ml en función del tiempo post servicio en días para la población seleccionada. El nivel promedio basal es de 148 ± 88 ng/ml. Se alcanzan niveles de 25800 ± 15000 ng/ml en el valor máximo de respuesta a los 68 ± 17 días. Se inicia la descarga de PMSG a los 52 ± 17 días y retorna a niveles basales en el entorno de los 181 ± 31 días. Los tiempos intercalados en el gráfico son solo marcadores del punto correspondiente y no corresponden con los promedios de la curva típica.



Gráfica 3. Muestra la variabilidad de eCG en diferentes períodos de una yegua sin preñez, con valores promedios basales de 148 ± 88 ng/ml. La gráfica representa los niveles de eCG en ng/mL en función del tiempo en días. Considerando una respuesta del orden de 20000 ng/mL el porcentaje expresado en la gráfica representa aproximadamente un 0.5 % de una respuesta positiva típica ($p < 0.00005$).

con un diagnóstico de gestación positivo por ecografía, observándose la elevación correspondiente en la curva de eCG a los 377 y 382 días.

DISCUSIÓN

Se optimizó la técnica de radioinmunoanálisis para las condiciones de la población a analizar. Se logró un procedimiento sensible y específico de detección de eCG en suero de yeguas preñadas. Los niveles de eCG basales se encuentran en la región de detección mínima del análisis y al presentar las curvas de preñez niveles 20 a 100 veces superiores a los niveles basales la sensibilidad así como la especificidad clínica resultaron altamente significativas.

La dosis mínima detectable (DMD) fue estimada en la misma matriz equina, la curva de calibración se extiende hasta niveles de 2500 ng/ml, el calibrador es preparado en una matriz que le confiere identidad con el analito endógeno. La probabilidad de reacción cruzada con hormonas hipofisarias es despreciable dado que los niveles hormonales de eCG en la preñez son significativamente más elevados que los niveles circulantes en sueros de yeguas no preñadas.

Con respecto al diseño del trabajo, las variaciones entre especímenes son propias del escaso número de datos ($n=4$) aunque desde el punto de vista de la respuesta al estímulo dichas variaciones son significativas.

Desde el punto de vista de la población seleccionada, el estado sanitario de los especímenes es excelente en lo referente a nutrición así como a atención médica recibida, dado que son animales de raza PSC. Las curvas normales de niveles de eCG a lo largo de la gestación son significativamente distintas en comparación con los niveles de eCG en yeguas vacías siendo hasta 200 veces superior a los niveles basales en el máximo de respuesta.

Analizando las curvas obtenidas en la población total y considerando la incidencia de problemas reproductivos en estos animales, se considera un importante logro la detección de una reabsorción en el grupo seleccionado. Observando las variaciones entre las muestras testigo y la observada en la yegua que mostró la reabsorción, las diferencias son al-

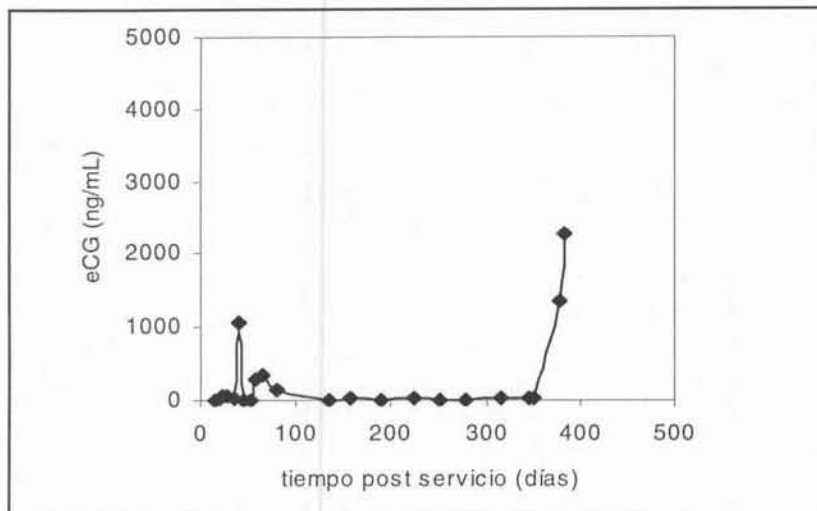


Figura 5. Muestra una curva de gestación con varios servicios efectuados: a los 2, 16 y 21 días se realiza la primera serie con gestación confirmada por ecografía. Posteriormente se presenta una nueva actividad ovárica. Se hace una segunda serie de servicios a los 296, 298 y 301 días con referencia al primero, se confirma, por ecografía, la ausencia de gestación. Se llevan a cabo nuevos servicios que terminan a los 329 días. De este último resultó un diagnóstico de gestación positivo por ecografía y se observa la elevación correspondiente en la curva de eCG. La gráfica representa en ordenadas los niveles de eCG en ng/mL encontrados en función del tiempo transcurrido en días.

tamente significativas entre sí y respecto a las basales.

La curva anormal descrita en la Fig. 5 no tuvo, en el intervalo de 400 días en los que se extrajeron muestras de sangre, niveles característicos de una preñez normal. Se hizo un primer servicio confirmando la gestación por ecografía que luego no fue acompañado por un aumento de la eCG en el tiempo correspondiente. Posteriormente se hicieron otros servicios en los cuales hay aumentos relativos y escasos de eCG que coinciden con el final del período de recolección de muestras. Los valores de eCG en esta etapa (del orden de 2000 ng/mL) sugieren que hay una gestación de no más de 40-50 días en curso.

CONCLUSIONES

La dosificación por radioinmunoanálisis de la eCG permite detectar niveles de

concentración más bajos y por lo tanto determinar con mayor sensibilidad el inicio de la producción de la hormona por las copas endometriales durante la gestación.

Dicho tiempo de inicio es, por esta metodología, de 52 ± 17 días lo cual si bien esta de acuerdo con la literatura, la dispersión de la media incorpora un dato clínico de valor para el diagnóstico.

El RIA es reproducible, altamente específico y sensible. Las mejores respuestas se producen en el intervalo de dosificación entre 10 y 1200 ng/mL basado en el patrón de calibración seleccionado.

La concentración de eCG medida en diluciones de sueros de yegua preñada, permitió descubrir un efecto de dilución que obliga a seleccionar suero equino libre (macho) como matriz para preparar el estándar de calibración así como las

diluciones de muestras excesivamente elevadas.

Se efectuaron extracciones semanales en los tiempos en que se requería conocer con precisión el momento de inicio de la producción de eCG. Posteriormente se efectuaron extracciones mensuales. Se hizo un muestreo que no perjudicó en nada a los animales. Desde el punto de vista de la investigación de los problemas reproductivos de la yegua, el seguimiento de niveles séricos de eCG tiene importancia en la detección de reabsorción como fenómeno inmunológico con una frecuencia no despreciable. En esta patología el comportamiento social del animal no siempre constituye una evidencia de la pérdida embrionaria siendo, en cambio, evidentes las caídas bruscas de niveles circulantes de eCG ($p < 0.001$).

En suma, se detectó precozmente una curva patológica en la población de yeguas preñadas por RIA de eCG sin comportamiento de celo, comprobándose luego de posteriores servicios, acompañados por ecografías positivas y niveles de eCG elevados que había una gestación en curso. La metodología aplicada es simple y de escasa agresividad para el animal teniendo precaución de cumplir los cuidados sanitarios requeridos.

Probablemente con una casuística mayor se pueda optimizar el umbral a partir del cual la secreción de eCG es significativa. Además la tendencia ascendente en determinaciones sucesivas ayuda en la estimación de ese umbral permitiendo que la reabsorción sea detectada con precisión aun más precozmente.

Agradecimientos

Dr. Alberto Carbo, (Haras "Los Apamates") por su aporte profesional. IQ. Ana Robles, (Centro de Investigaciones Nucleares) por su constante dedicación en las actividades de laboratorio con la cual pudimos saltar muchas dificultades.

Al Sr. Rocha (Haras "Los Apamates") por su buena voluntad permanentemente en las actividades con los animales.

Referencias bibliográficas

1. Allen, W.R., y Moor, R.M. (1972) The origin of the equine endometrial cups: In: Production of PMSG by fetal trophoblast cells. J.Reprod. Fertil.(29):313-316.
2. Benitez Ortiz, W.(1992) Diagnostic de gestation et etude de la mortalite embryonnaire chez les ruminants par dosage de la pregnancy associated glycoprotein (PAG): In Tesis Ph.D. Prod. Anim. Trop. Antwerpen, Belgique, Institut de Médecine Tropicale Prince Leopold, Departement de Production et Santé Animales; Liege, Belgique, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liege Service de Physiologie de la Reproduction.
3. Bodgan, I.(1988),Determination of blood PMSG concentration in mare of different breeds in Romania. Mon. hefte. Vet. Med.(43):165-166.
4. Brendemuehl, et al.(1996). Effect Of grazing endophyte-infected tall fescue on eCG and progesterone concentration from gestation day 21 to 300 in the mare. Theriogenology (46):85-96.
5. Ekins, R.P.; Newman, G.B. and O'Riordan, J.L.(1968)Theoretical aspects of "saturation" and radioimmunoassay. *In: Radioisotopes in medicine: In vitro studies.* Oak Ridge, Tenn., U.S. Atomic Energy Commission, pp 59-100.
6. ———(1974) Automation of radioimmunoassay and other saturation assay procedures. In Proceeding, Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine. Viena, International Atomic Energy Agency, pp.91-109.
- 7- Evans, G. and Robinson, T.J. (1980) The control of fertility in sheep: endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and anestrus. J. Agric. Sci. (Print) 94:69-88.
8. Goudet, G.; Leclercq, L.; Bezard, J.; Duchamp, G.; Guillaume, D. (1998) E.Chorionic Gonadotropin secretion is associated with an inhibition of follicular growth and improvement in oocyte competence for in vitro maturation in the mare. Biol. Reprod, pp.760- 768.
9. Hoppen, H.O. (1994) The equine placenta and chorionic gonadotropin an overview. Exp. Clin. Endocrinol.102:235-243.
10. Lothar, S. (1978) Tabla 1.25-Límites de significación de la distribución de Student. *In: Estadística Aplicada.* Barcelona, Labor. p 121.
11. Murphy, B.D.; Martinuk, S.D. (1991) Equine Chorionic Gonadotropin. Endocr. Rev. 12(1): 27-44.
12. Naqvi, SM.; Gulani, R. (1998)The effect of gonadotrophin releasing hormone and follicle stimulating hormone in conjunction with pregnant mare serum gonadotrophin of the superovulatory reponse in crossbred sheep in India. Trop. Anim. Health Prod. 369-376.
13. Nett, T. and Gielen, J. (1975).The development of a monoclonal antibody against PMSG for veterinary application. Livest. Prod. Sci (42):223.228.
14. Rubianes, E.; Ungerfeld,R. (1995) Superovulatory response in anestrus ewes is affected by the presence of a large follicle. Theriogenology (43): 465-472.
15. Stewart, F. and Allen, W. (1979). The binding of FSH, LH and PMSG to equine gonadal tissues. J. Reprod. Fertil. Suppl .27:431-440.
16. Ungerfeld, R.; Viñoles, C.; Rubianes, E. (1993) Obtención y valoración del suero anti PMSG. Veterinaria, 119: 18-22.
17. Yalow, R.S. and Berson, S.A.(1968) General principles Of radioimmunoassay. *In: Radioisotopes in medicine, in vitro studies.* Oak Ridge, Tenn., U.S. Atomic Energy Commission, pp 7-41.