

ESTUDO DA TÉCNICA DE COLETA, CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO DE EMBRIÕES DE CAPRINOS (*Capra hircus*), DA RAÇA SAANEN, PORTADORES DA TRANSLOCAÇÃO 5/15

STUDY OF EMBRYOS COLECT TECHNIQUE, FROZEN AND THAWING OF SAANEN (*Capra hircus*), GOATS BEARING 5/15 TRANSLOCATION

Nereu Carlos PRESTES¹; Cezinande de MEIRA²; Carlos Antonio de Miranda BONFIM³;
Sony Dimas BICUDO¹; Maria Denise LOPES¹; Frederico Ozanam PAPA⁴

RESUMO

No presente trabalho foi realizado um estudo da técnica cirúrgica de coleta de embriões na espécie caprina, utilizando-se doadoras heterozigotas para a translocação 5/15, acasaladas com animal translocado. Simultaneamente foram observados aspectos técnicos inerentes à criopreservação, descongelamento e cultivo das estruturas recuperadas. Frente ao tratamento superovulatório, o cio foi observado em 24 ou 48 horas após a remoção da esponja intravaginal e foram recuperadas 71 estruturas viáveis em 43 coletas. O 1-2 Propanodiol mostrou-se eficiente crioprotetor, permitindo cultivo de todos os embriões, fato não observado quando utilizou-se o Glicerol. As aderências provocadas pelas repetidas coletas constituem-se no grande desafio no sentido de se aperfeiçoar a técnica, pois são consideradas um fator limitante ao uso de doadores no início da vida reprodutiva.

UNITERMOS: Embriões; Criopreservação; Descongelamento; Caprinos

INTRODUÇÃO E LITERATURA

Historicamente, o desenvolvimento das técnicas de coleta, congelamento, descongelamento e transferência de embriões tem duas fases.

O primeiro trabalho utilizando a cabra como material experimental no estudo da morfologia embrionária foi realizado por AMOROSO et al.¹ (1942). Em 1963, NISHIKAWA e ONUMA², verificaram que o ovário de fêmeas da raça Saanen foi extremamente sensível à ação do FSH como indutor de superovulação.

MOORE³ (1974) utilizou esponjas intravaginais de poliuretano, embebidas com progesterona com o intuito de induzir o cio em caprinos, permanecendo inseridas por 16 a 22 dias, obtendo excelentes resultados. O mesmo autor coletou embriões de cabras doadoras, 96 a 132 horas após a primeira cobertura, por meio cirúrgico, pela linha branca, sob anestesia geral (Nembutal). Avaliou a reação ovariana, lavou tubas e cornos uterinos para recuperar embriões, empregando PBS (Phosphate Buffered Saline) como meio, enriquecido com 10% de soro de cabra heterólogo. Referiu média superior a 7 embriões por doadora.

NUTI et al.¹⁰ (1987) trabalhando com 35 cabras pura Nubianas

e Alpinas, promoveram coleta cirúrgica de embriões aos 7 dias após a cobertura. Foram recuperadas 36 estruturas (X = 1,02), lavando a tuba e cornos uterinos pela inserção de catéter tipo Foley número 8 e 50 ml de PBS, pH 7,2 com 5% de soro de albumina bovina e 1% de antibiótico.

BARIL et al.² (1989) lavaram tubas e cornos uterinos de caprinos superovulados recolhendo 17 embriões de 6 dias das 52 doadoras operadas.

BILTON e MOORE³ (1976) trabalhando com cultivo e preservação de embriões caprinos congelaram 7 estruturas em palheta contendo 0,3 ml de PBS + 25% de soro de cabra heterólogo, adicionado de 2M de glicerol ou 0,4 M de DMSO. Reduziram a temperatura 1,0°C/minuto, até 6°C, permanecendo por 40 minutos. Posteriormente as palhetas foram transferidas para recipiente contendo etanol gelado, reduzindo a temperatura em 0 a 2 ou 1 a 4°C/minuto. A cristalização foi induzida aos -2,5°C. Atingindo -60°C as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido. A descongelamento foi promovida em etapas de 8°C/minuto. Sugeriram que o glicerol foi mais efetivo como crioprotetor que o DMSO.

Segundo POLGE e WILLADSEN¹¹ (1978), estruturas embrionárias em idades diferentes e de espécies distintas apresentaram grau de tolerância variável à congelamento.

1 - Professor Assistente Doutor - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP - Campus de Botucatu

2 - Professor Assistente - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP - Campus de Botucatu

3 - Médico Veterinário - Residente - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP - Campus de Botucatu

4 - Professor Adjunto - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP - Campus de Botucatu

Para BOUTRON³ (1984), uma criteriosa avaliação da cristalização deve ser efetuada, pois este foi o ponto crítico dos danos provocados à célula durante a congelamento. Notou que a máxima cristalização do gelo foi menos intensa com o 1-2 Propanodiol do que com o glicerol.

Para HALASZ e COLLINS⁶ (1984); WILDT et al.¹³ (1986); FRIELDLER et al.⁵ (1988), o Propanodiol pode ser menos tóxico que o glicerol e o DMSO. Concordaram também que dada a sua estabilidade a baixas temperaturas, o Propanodiol limitou a formação de cristais de gelo durante a congelamento e descongelamento. Admitiram ainda que pode ser utilizado com outros agentes na tentativa de reduzir os danos osmóticos e a toxicidade específica.

Segundo FRIELDLER et al.⁵ (1988) a sucrose não penetra na célula e seu efeito protetor foi verificado submetendo células a diluições sucessivas após a descongelamento rápida com o intuito de reidratação.

BARIL et al.² (1989) promoveram a descongelamento de 203 embriões de caprinos, mergulhando as palhetas em água a 37°C por 30 segundos, obtendo índice de sucesso de 68%.

O objetivo deste trabalho foi testar métodos de indução do cio e de superovulação, bem como promover a coleta cirúrgica, congelamento e descongelamento de embriões em um grupo de cabras da raça Saanen sabidamente portadoras de translocação 5/15.

MATERIAL E MÉTODO

Animais

Foram utilizadas 16 cabras adultas da raça Saanen, com sanidade física e fertilidade comprovadas, portadoras de translocação 5/15 em estado heterozigoto, cruzadas com macho Saanen translocado heterozigoto. No mesmo grupo de animais, procederam-se 21 tentativas de coleta na estação de atividade reprodutiva de 1989 e 22 intervenções na estação cíclica de 1990.

Indução de Cio e Método de Superovulação

Aplicaram-se três fórmulas baseadas em métodos propostos por MOORE⁸ (1987) descritos a seguir.

Cada esponja vaginal de espuma sintética, recebeu, 24 horas antes do uso, 1 ml de Penicilina^a e 60 mg de Acetato de Medroxiprogesterona^b, deixadas secar à temperatura ambiente.

a = Pentabiótico Veterinário - 1.200.000 UI FONTOURA WYETH S/A

b = PROMONE - E - 50 mg/ml - Solução aquosa estéril UPJOHN S/A

c = CIOSIN - Prostaglandina Sintética (cloprostenol) COOPERS DO BRASIL S/A

d = FSH-P (Follicle Stimulating Hormone - Pituitary) 50 mg - SHERING CORPORATION USA

O cio foi desencadeado pela aplicação do Cloprostenol^c e a superovulação foi estimulada pelo uso de FSH-P^d.

Programa I

Iniciado 10 dias após a observação do cio natural, ou induzido pelo uso de esponja intravaginal.

D10 -	tarde	-	4 mg FSH ^d
D11 -	manhã	-	2 mg FSH
	tarde	-	2 mg FSH
D12 -	manhã	-	2 mg FSH
	tarde	-	2 mg FSH + 100 ug Cloprostenol ^c
D13 -	manhã	-	2 mg FSH + 100 ug (0,4ml) Cloprostenol
	tarde	-	2 mg FSH
D14 ou D15		-	Observação de cio e cobertura

Programa II

DZero -	Inserção da esponja intravaginal		
D8 -	manhã	-	4 mg FSH ^a e 100 ug Cloprostenol
	tarde	-	4 mg FSH
D9 -	manhã	-	2 mg FSH
	tarde	-	2 mg FSH
D10 -	manhã	-	2 mg FSH
	tarde	-	2 mg FSH - remoção da esponja
D11 ou D12		-	Cio e cobertura

Programa III

DZero	Colocação da esponja intravaginal		
D10 -	manhã	-	4 mg FSH
	tarde	-	4 mg FSH
D11 -	manhã	-	3 mg FSH
	tarde	-	3 mg FSH
D12 -	manhã	-	2 mg FSH
	tarde	-	2 mg FSH e 150 ug Cloprostenol
			Remoção da esponja
D13 - D14 ou D15		-	Cio e cobertura

Para detecção do cio foi utilizado macho vasectomizado como rufião, colocado em contacto com as fêmeas, em intervalos de 12 horas.

Coleta de Embriões

A coleta foi efetuada 5 a 6 dias após a cobertura. Os animais foram submetidos a hipnoanalgesia utilizando Cloridrato de Xilazina^e e infiltração local com Xilocaina a 2%^f. Seguiu-se realizando a incisão de aproximadamente 15 cm de comprimento, preferencialmente no flanco esquerdo, expondo o trato reprodutivo. Os ovários foram observados a fim de estimar o sucesso da coleta. A tuba foi lavada inserindo-se tubo plástico de diâmetro compatível, adaptado em agulha, guiado e interiorizado através da fímbria, injetando-se lenta e suavemente 3 a 5 ml de solução de PBS^g aquecida a 37°C, fluindo em direção ao corno uterino.

A lavagem do útero foi efetuada a seguir, através de pequena incisão (1 a 1,5 cm), próxima à bifurcação. Foi introduzido, em direção ao corno uterino, um catéter de Foley^h pediátrico nº 9 (25 cm - bulbo 3,0 cm³), ou sonda endotraquealⁱ infantil, nº 3 a 3,5, cujo balonete foi inflado com ar, prevenindo o refluxo do meio. Na extremidade oposta, próximo à junção útero-tubárica foi inserida uma agulha 50x15 ou catéter de Teflon^j (14x5,5). O corno uterino foi lavado pelo fluxo com turbilhonamento do PBS a 37°C, 20 a 40 ml, em ambos os sentidos, recolhendo o meio em placa de Petri^k estéril aquecida. Repetiu-se a operação no corno contralateral.

A incisão aberta no útero foi suturada em modelo invaginante utilizando-se categute 3-0 agulhado^l. A síntese da parede abdominal foi realizada em dois planos de sutura contínua com fio absorvível número 2^m e a sutura da pele foi efetuada em pontos isolados (U-horizontal), com fio de algodãoⁿ.

O meio recuperado foi examinado sob lupa^o, a fim de quantificar e qualificar os embriões.

Preparo - Congelação

Para o Grupo 1 (Tab. 3), a desidratação foi processada por passagens sucessivas das estruturas durante 8 minutos cada, conforme o esquema abaixo :

Solução 1

4,5 ml PBS + 0,5 ml SFB^p (10%) + 0,18 ml Glicerol (3,3%)

e = Runpum - BAYER DO BRASIL S/A

f = Cloridrato de Lindocaina - LEPEPITT S/A

g = Dulbecco modificado 500 ml - CULTILAB

h = Latex Foley Catheter - com válvula - PERRY - USA

i = Rusch 14-16, W. Germany Wa nº 3 ou Bn nº 3,5

j = Radiopaque Fep Teflon L. V. Catheter T 14 - Gx5 1/2 - ABBOT - USA

Solução 2

4,5 ml PBS + 0,5 ml SFB (10%) + 0,36 ml Glicerol (6,6%)

Solução 3

4,5 ml PBS + 0,5 ml SFB (10%) + 0,36 ml Glicerol (10,0%)

Para o grupo 2 (Tab. 3) a desidratação foi efetuada por passagens sucessivas das estruturas, conforme segue:

Solução 1

PBS + 20% SFB + 0,75 M de Propanodiol durante 5 minutos

Solução 2

PBS + 20% SFB + 1,50 M de Propanodiol durante 10 minutos

Após este tempo, os embriões foram envasados em palhetas^q de 0,5 ml, previamente identificadas e congelados pelo método rápido, utilizando o cilindro de Peter Elsdén adaptado na boca do botijão de nitrogênio líquido (SOUZA; DE BEM¹², 1988).

A curva de congelamento utilizada, obedeceu o seguinte gráfico (Fig. 1).

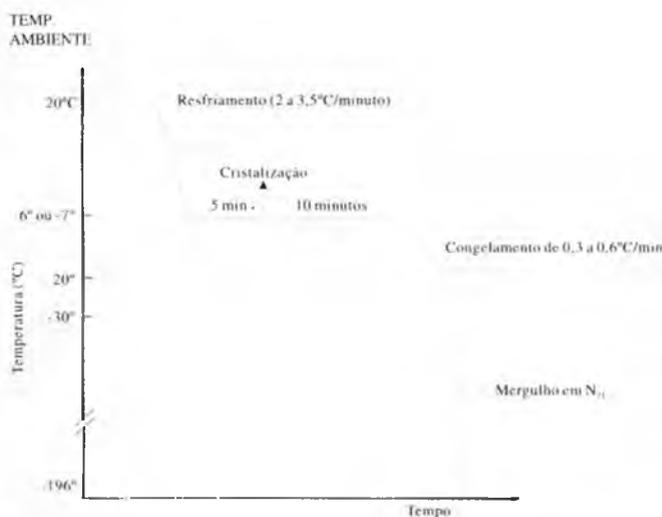


FIGURA 1

Gráfico da Curva de Resfriamento e Congelação de Embriões Caprinos realizada com cilindro na Boca do Botijão. Botucatu - SP, 1991.

k = Placas de Petry - PYREX - 100x15

l = Categute cromado 3-0 - 75vm - BRASMÉDICA S/A

m = Categute cromado 2-0 - CIRUMÉDICA Brasil S/A

n = Linha Mercerizada - 000 - CORRENTE S/A LTDA

o = Esteromicroscópio CARL ZEISS - JENA MICRONAL - MICRONAL

p = SFB - soro fetal bovino

q = Palhetas de polietileno - PAILLETES BOVINES - REF A.A 101 - I.M.V.

Descongelamento e Reidratação

Para o Grupo 1 as palhetas foram mergulhadas em água a 37°C por 20 segundos e as estruturas foram submetidas a três passagens sucessivas, conforme segue:

- 1 - 4,5 ml HAM'S F10 + 10% SFB + Glicerol 6,6% - 8 minutos;
- 2 - 4,5 ml HAM'S F10 + 10% SFB + Glicerol 3,3% - 8 minutos;
- 3 - 4,5 ml HAM'S F10 + 10% SFB - 8 minutos.

Para o Grupo 2 as palhetas congeladas foram mergulhadas em água a 37°C por 20 segundos e as estruturas foram submetidas a quatro passagens sucessivas em solução de Propanodiol e Sucrose.

- 1 - 1,0 M Propanodiol + 0,2 M Sucrose - 6 a 7 minutos;
- 2 - 0,5 M Propanodiol + 0,2 M Sucrose - 6 a 7 minutos;
- 3 - 0,0 M Propanodiol + 0,2 M Sucrose - 6 a 7 minutos;
- 4 - PBS puro ou HAM'S F10.

RESULTADOS

TABELA 1

Tempo de ocorrência do cio após a remoção da esponja intravaginal nos animais cujo estro foi induzido. Botucatu - SP, 1991.

ANO	Nº DE ANIMAIS	CIO NÃO OBSERVADO	NÚMERO DE ANIMAIS EM CIO			
			12h	24h	36h	48h
1989	21	2	0	8	1	10
1990	22	1	0	10	0	11
TOTAL	43	3	0	18	1	21

Em todos os animais, no ato da remoção da esponja, foi observado corrimento vaginal, diagnosticado como vaginite por reação a corpo estranho, que recuperava em 2 a 3 dias sem tratamento.

TABELA 2

Número de estruturas colhidas na dependência do tratamento superovulatório imposto, promovendo a lavagem das tubas e cornos uterinos. Botucatu - SP, 1991.

PROGRAMA	NÚMERO DE ANIMAIS TRATADOS	ESTRUTURAS VIÁVEIS	ESTRUTURAS INVIÁVEIS
II	27	58	3
III	1	4	0
I	15	9	0
TOTAL	43	71	3

TABELA 3

Número de estruturas congeladas com diferentes criopreservadores e embriões cultivados a fresco. Botucatu - SP, 1991.

GRUPO	NÚMERO DE ESTRUTURAS	CRIOPRESERVADOR	CRESCIMENTO EM CULTIVO* (VIABILIDADE)
1	38	Glicerol	-
2	20	1-2 Propanodiol	+
3	13	A fresco	+
TOTAL	71		

* Meio de cultura: PBS + Soro fetal bovino 10% ou HAM'S F10 (CULTILAB).

TABELA 4

Resposta ovariana ao tratamento superovulatório. Botucatu - SP, 1991.

ANO	NÚMERO DE ANIMAIS	REACÇÃO OVARIANA			
		OVÁRIO COM CORPOS LÚTEOS	OVÁRIOS COM FOLÍCULOS ANOVULATÓRIOS	OVÁRIO NÃO REATIVO	OVÁRIO ADERIDO
1989	21	14	7	0	0
1990	22	11	2	2	7
TOTAL	43	25	9	2	7

DISCUSSÃO

Neste experimento trabalhou-se com um grupo de caprinos, portadores de translocação cromossômica 5/15. Espécie que revelou ser bastante sensível aos tratamentos hormonais indutores do estro e múltiplas ovulações. Neste aspecto, concordam plenamente NISHIKAWA e ONUMA⁹ (1963).

Os primeiros passos foram dados por AMOROSO et al.¹ (1942) que promoviam a detecção visual do cio normal, pois não se conheciam técnicas indutoras e as drogas eram escassas e de pureza duvidosa.

Foram empregados programas baseados no uso da esponja intravaginal impregnada com progesterona, aplicação de Cloprostenol e FSH-P em injeções intramusculares como métodos indutores do estro e superovulação. Para a detecção do cio foi utilizado rufião vasectomizado. Metodologia semelhante foi descrita por MOORE⁷ (1974).

Dos 43 animais submetidos aos programas, em 3 não foi observado cio, 18 exteriorizaram sinais em 24 horas, 1 em 36 horas e 21 em 48 horas após a remoção da esponja (Tab. 1). Resultados concordantes foram obtidos por NUTI et al.¹⁰ (1987). Foi observada a presença de corpos lúteos nos ovários, sugerindo resposta ao tratamento superovulatório imposto (Tab. 4).

Os meios de coleta sofreram, no decorrer do tempo, inúmeras modificações, evoluindo para substâncias puras e quimicamente conhecidas.

Procedeu-se a técnica de coleta cirúrgica, via flanco, que permitiu total exposição do trato reprodutivo, propiciando fácil lavagem das tubas e útero. A laparotomia foi efetuada 5 a 6 dias após a cobertura, utilizando-se PBS a 37°C como meio de coleta. Técnicas semelhantes foram descritas por MOORE⁷ (1974); NUTI et al.¹⁰ (1987). Foram recuperadas 71 estruturas de 43 animais, devendo-se ressaltar que alguns animais redundaram em coleta negativa, embora apresentassem excelente reação ovariana (Tab. 2). Impressões e resultados semelhantes foram descritos por NUTI et al.¹⁰ (1987). Este fato pode ser atribuído aos repetidos tratamentos hormonais, às falhas na técnica de coleta, ou ser devido a provável subfertilidade dos animais translocados.

A formação de aderências decorrentes do manuseio, representou o ponto crítico e por vezes limitante das repetidas coletas.

Em pequenos ruminantes, particularmente caprinos, pouco tem sido estudado a respeito da biotecnologia embrionária. É pouco seguro extrapolar resultados de congelação de embriões de uma espécie para outra, pois há sensíveis diferenças quanto à fase de desenvolvimento, curva de congelação e grau de tolerância aos agentes crioprotetores, no que concordam POLGE e WILLADSEN¹¹ (1978).

A descongelação de 38 embriões preservados em Glicerol redundou em fracasso de desenvolvimento em cultivo. Em todos os embriões cultivados imediatamente após a coleta ou criopreservados com o 1-2 Propanodiol, foi constatado 100%

de viabilidade e crescimento no meio de cultura (Tab. 3). Resultados semelhantes foram relatados por BILTON; MOORE³ (1976); BOUTRON⁴ (1984) e HALASZ; COLLINS⁶ (1984); WILDT et al.¹³ (1986); FRIEDLER et al.⁵ (1988).

O envasamento e congelação seguiram padrões clássicos da curva, resfriamento, cristalização, congelação, armazenamento, com o cilindro de aço adaptado na boca do botijão de Nitrogênio líquido. A descongelação foi promovida, mergulhando as palhetas em água a 37°C por 20 segundos, semelhante ao proposto por BARIL et al.² (1989).

A descongelação e reidratação foram executadas levando os embriões a três passagens sucessivas contendo sucrose que, pelo fato de não penetrar na célula, teve efeito osmótico significativo, reduzindo o dano celular. Esta técnica foi coincidente à apresentada por FRIEDLER et al.⁵ (1988) e BARIL et al.² (1989).

CONCLUSÕES

- A maioria dos animais reagiu bem ao tratamento indutor de cio e método superovulatório;
- Em todos os animais tratados com esponja intravaginal, observou-se uma vaginite após sua remoção;
- A laparotomia via flanco permite fácil acesso e lavagem do útero e tubas para coleta de embriões;
- A média de embriões obtida foi considerada satisfatória para o grupo de animais estudados;
- Foram observadas aderências dos genitais após repetidas laparotomias;
- O 1-2 Propanodiol mostrou-se mais efetivo crioprotetor que o Glicerol;
- Os embriões congelados com o Glicerol não se desenvolveram em cultivo, ao contrário daqueles cultivados à fresco ou preservados com 1-2 Propanodiol.

SUMMARY

This work studied the surgical technique for collecting embryos in the goat, using heterozygous donors for the 5/15 translocation, which were bred with translocated animals. At the same time technical characteristics related to cryopreservation, thawing and cultivation of the structures were performed. Considering the superovulatory treatment, oestrus was observed 24 or 48 hours after removing the intravaginal sponge and 71 viable structures were yielded in 43 collections. The 1-2 Propanediol proved to be an efficient cryoprotectant agent, and allowed the cultivation of all the embryos. This result was not observed when glycerol was used as a cryoprotectant agent. Adhesions due to multiple collections constitute a great challenge for the improvement of this technique, since they are considered a limiting factor to the use of donors in the beginning of their reproductive lives.

UNITERMS: Embryos; Cryopreservation; Thawing; Goats

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01-AMOROSO, E.C.; GRIFFITHS, W.F.B.; HAMILTON, W.G. The early development of the goat (*Capra hircus*). **Vet. Rec.**, v.51, p.377-404, 1942.
- 02-BARIL, B.; CASAMITJANA, P.; PERRIN, J.; VALLET, J.C. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. **Zuchthygiene**, v.24, p.101-11, 1989.
- 03-BILTON, R.J.; MOORE, N.W. In vitro culture, storage and transfer of goat embryos. **Aust. J. Biol. Sci.**, v.29, p.125-9, 1976.
- 04-BOUSTRON, P. More accurate determination of the quantity of ice crystallized at low cooling rates in the glycerol and 1,2-Propanediol aqueous solutions: Com-
- 05-FRIEDLER, S.; GIUDICE, L.C.; LAMB, E.J. Cryopreservations of embryos and ova. **Fertil. and Steril.**, v.49, n.5, p.743-64, 1988.
- 06-HALASZ, N.A.; COLLINS, G.M. Studies in cryopreservation II Propylene glycol and glycerol. **Cryobiology**, v.21, p.144-7, 1984.
- 07-MOORE, N.W. Multiple ovulations and ovum transfer in the goat. **Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.**, v.10, p.246-9, 1974.
- 08-MOORE, N.W. Techniques and advances in the recovery storage and transfer of embryos in the goat. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF GOATS, 4., Brasília, 1987. **Proceedings**. Brasília- EMBRAPA, 1987. v.1, p.587-99.
- 09-NISHIKAWA, Y.; ONUMA, H. Studies on the transplantation of ova (artificial pregnancy) in goats. **Proc. - Jap. Acad.**, v.39, p.519-24, 1963.
- 10-NUTI, L.C.; MINHAS, B.S.; BAKER, W.C.; CAPEHART, J.S.; MARRACI, P. Superovulation and recovery of zygotes from Nubian and Alpine dairy goats. **Theriogenology**, v.28, n.4, p.481-9, 1987.
- 11-POLGE, C.; WILLADSEN, S.M. Freezing eggs and embryos of farm animals. **Cryobiology**, v.15, p.370-3, 1978.
- 12-SOUZA, R.B.; DE BEM, A.R. Congelamento de embriões isocriogen. In: REUNIÃO ANUAL E I REUNIÃO INTERNACIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 3., Santa Maria, 1988.
- 13-WILDT, D.E.; SCHIEW, M.C.; SCHMIDT, P.M.; GOODROWE, K.L.; HOWARD, J.G.; PHILLIPS, L.G.; O'BRIEN, S.J.; BUSH, M. Developing animal model systems for embryo technologists in rare and endangered wildlife. **Theriogenology**, v.25, n.1, p.33-49, 1986.

Recebido para publicação em 10/12/91
Aprovado para publicação em 02/07/93