

Comparación de distintos métodos de preservación traqueal

Dres. Boglione M, Morandini M, Siminovich M, Aguilar D.

Area Trasplante de Pulmón y Servicio de Anatomía Patológica. Hospital J. P. Garrahan. Buenos Aires.

Resumen

El objetivo de este estudio fue comparar distintos métodos de preservación traqueal en un modelo isogénico heterotópico de implante inmediato y con 24 horas de preservación.

Ochenta ratas Sprague-Dawley endocriadas, con un peso de 300 - 340 gramos fueron utilizadas como donantes y receptores divididas en ocho grupos: A: trasplante inmediato, no Euro-Collins, no criopreservación; B: trasplante inmediato, sí Euro-Collins, no criopreservación; C: trasplante 24 horas, no Euro-Collins, no criopreservación; D: trasplante 24 horas, sí Euro-Collins, no criopreservación; E: criopreservación luego de 24 horas a 4° C, no Euro-Collins; F: criopreservación inmediata, no Euro-Collins; G: criopreservación luego de 24 horas a 4° C, sí Euro-Collins; H: criopreservación inmediata, sí Euro-Collins. Todos los injertos fueron implantados en epiplón. Tres muestras para estudio microscópico fueron tomadas de cada espécimen: inmediatamente después de la ablación, inmediatamente antes del implante (al finalizar el período de preservación) y en el momento del sacrificio. No hubo muertes antes del tiempo establecido. Los scores de daño histológico del material obtenido en el momento del sacrificio fueron: grupo A: 3,1; grupo B: 1,7; grupo C: 3; grupo D: 1,1; grupo E: 3,2; grupo F: 3,7; grupo G: 1,3 y grupo H: 1. Todos los injertos presentaban la luz ocupada por granulomas. La preservación con Euro Collins es superior a la preservación sin Euro Collins tanto en tráqueas criopreservadas como no criopreservadas. La criopreservación es una estrategia válida para la obtención de injertos traqueales. Los injertos criopreservados presentan lesiones leves aunque más severas que aquellos no criopreservados. La irrigación con Euro Collins permite preservar tráqueas hasta 24 horas a 4° C.

Palabras clave: Implante de tráquea - Preservación traqueal - Criopreservación - Ratas.

Summary

The objective of this study was to compare different method of tracheal preservation in an isogenic-heterotopic model of immediate implantation with up to 24 hours of preservation.

Eighty Sprague-Dawley rats with a weight between 300 and 350 grams were used both as donors and recipients after dividing them in eight groups. Group A had immediate tracheal transplant, no Euro-Collins solution and no cryopreservation; Group B had immediate tracheal transplant, Euro-Collins solution and no cryopreservation; Group C had the transplant in 24 hours, no Euro-Collins and no cryopreservation; Group D had the transplant at 24 hours, Euro-Collins and no cryopreservation; Group E had cryopreservation after 24 hours at 4° C with Euro-Collins; Group F had immediate cryopreservation, no Euro-Collins; Group G had cryopreservation after 24 hours at 4° C with Euro-Collins, and Group H had immediate cryopreservation with Euro-Collins. All grafts were implanted using omentum. Three samples of each specimen were taken for microscopic studies: immediately after ablation, after transplantation and upon sacrifice of the animal. No rat died before the established time. The score of histologic damage in the specimen obtained at sacrifice were: Group A: 3.1; Group B: 1.7; Group C: 3; Group D: 1.1; Group E: 3.2; Group F: 3.7; Group G: 1.3; and Group H: 1. All grafts developed granulomas inside the tracheal lumen. Preservation using Euro-Collins solution is superior despite cryopreservation of the trachea. Cryopreservation is a valid strategy to obtain tracheal grafts. Cryopreserved grafts showed mild lesions when compared with no cryopreservation. Irrigation with the Euro-Collins solution permits to preserve tracheas up to 24 at 4° C.

Index words: tracheal implantation - Tracheal preservation - Criopreservación - Rats.

Resumo

O objetivo deste estudo foi comparar distintos métodos de preservação traqueal em um modelo isogénico heterotópico de implante imediato e com 24 horas de preservação.

Oitenta ratas Sprague-Dawley endocriadas, com um peso de 300 à 340 gramas foram utilizadas como doadoras e receptoras, divididas em oito grupos: A- transplante imediato, sem Euro-collins, sem criopreservação; B- transplante imediato, com Euro-collins, sem criopreservação; C- transplante de 24 horas, sem Euro-collins, sem criopreservação; D- transplante de 24 horas com Euro-collins, sem criopreservação; E- criopreservação depois de 24 horas a 4°C, sem Euro-collins; F- criopreservação imediata, sem euro-collins; G- criopreservação depois de 24 horas a 4°C, com Euro-collins; H- criopreservação imediata, com Euro-collins. Todos os enxertos foram implantados em epiplón. Três amostras para estudo microscópico foram tomadas de cada espécimen: imediatamente depois da ablação, imediatamente antes do implante (ao finalizar o período de preservação) e no momento do sacrifício. Não houve morte antes do tempo estabelecido. Os escores de dano histológico do material obtido no momento do sacrifício foram: grupo A: 3,1; grupo B: 1,7; grupo C: 3; grupo D: 1,1; grupo E: 3,2; grupo F: 3,7; grupo G: 1,3 y grupo H: 1. Todos os enxertos apresentavam a luz ocupada por granulomas. A preservação com Euro-collins é superior a preservação sem Euro-collins tanto em traquéas criopreservadas como não criopreservadas. A criopreservação é uma estratégia válida para a obtenção de enxertos traqueais. Os enxertos criopreservados apresentam lesões leves embora mais sérias que aqueles não criopreservados. A irrigação com Euro-collins permite preservar traquéas até 24 horas a 4°C.

Palavras chave: Implante traqueal - Preservação traqueal - Criopreservação - Ratos.

Introducción

La reconstrucción traqueal es necesaria en casos de estenosis extensa secundaria a

enfermedades congénitas, traumatismos o neoplasias. Varios autores¹⁻⁷ han investigado el trasplante como una alternativa a la cirugía convencional utilizando diferentes estrategias: trasplante ortotópico², heterotópico^{4, 8}, omentopexia^{5, 9, 10}, anastomosis del pedículo vascular traqueal^{3, 11}, irrigación del injerto^{12, 13} y criopreservación¹⁴⁻¹⁷.

Interesados en un implante de tráquea como alternativa terapéutica, hemos desarrollado una línea de trabajo experimental para explicar las posibilidades del homoinjerto.

Previamente demostramos que el trasplante inmediato de tráquea cervical sin omentopexia es posible¹⁸.

En este estudio comparamos distintos métodos de preservación traqueal en un modelo isogénico de trasplante heterotópico inmediato y con 24 horas de preservación.

Material y Método

Animal: Ochenta ratas Sprague-Dawley endocriadas, con un peso de 300 - 340

gramos fueron utilizadas como donantes y receptores en un modelo isogénico de implante heterotópico de tráquea. Todos los animales recibieron trato humanizado acorde con los "Principios de Cuidados de Animales de Laboratorio" formulados por la National Society for Medical Research y la "Guía para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio" preparada por la National Academy of Sciences y publicada por el National Institute of Health (NIH publicación 85-23, revisada en 1985).

Grupos: 1° etapa (tráqueas no criopreservadas): Los animales fueron divididos en 4 grupos (n=5); grupos A y B trasplantados inmediatamente y grupos C y D trasplantados luego de preservar la tráquea a 4°C durante 24 horas. Los animales de los grupos A y C no fueron irrigados con Euro Collins mientras que los animales de los grupos B y D sí.

2° etapa (tráqueas criopreservadas): Fueron for-

mados 4 grupos (n=5). En los grupos F y H las tráqueas fueron criopreservadas inmediatamente luego de la ablación; en los grupos E y G fueron congeladas luego de permanecer 24 horas a 4° C. No recibieron Euro Collins los animales de los grupos E y F, mientras que sí recibieron los de los grupos G y H (cuadro 1).

Grupo	Trasplante		Euro-Collins	Criopreservación
	Inmed	24 hs.		
A	+	-	No	No
B	+	-	Sí	No
C	-	+	No	No
D	-	+	Sí	No
E	-	+	No	Sí
F	+	-	No	Sí
G	-	+	Sí	Sí
H	+	-	Sí	Sí

Cuadro 1: material y métodos, conformación de los grupos experimentales. Inmed: inmediato.

Donante: Cuarenta ratas fueron anestesiadas con la administración intraperitoneal de 20 mg/kg de pentobarbital sódico luego de una inducción con isoflurano 5 %. Seguidamente las ratas fueron colocadas en posición supina y sujetadas a la mesa. Recibieron una infusión endovenosa de 1000 UI/Kg de heparina aplicada en la vena dorsal del pene y se llevó a cabo una esternotomía mediana bajo ventilación espontánea. Luego la tráquea fue ablacionada. En los donantes que recibieron Euro Collins la aorta ascendente fue canulada, la aorta torácica descendente clamepada a nivel del diafragma y las venas cavas superior e inferior seccionadas. Luego se infundió por la aorta ascendente 20 ml de solución de Euro-Collins fría (4°C) a 20 cm H₂O de presión.

Receptor y procedimiento quirúrgico: Los animales fueron anestesiados usando isoflurano 5 % como inducción, seguido de la inyección subcutánea de ketamina (25 mg/kg). Bajo ventilación espontánea, una laparotomía mediana supraumbilical permitió extraer el epiplón y envolver en él un segmento traqueal de seis anillos; luego de fijar la envoltura con puntos separados de poligalactina 9/10 (Vicryl®) 6/0 fue reintroducido en la cavidad. El cierre del abdomen se llevó a cabo con sutura continua de nylon (Prolene®) 4/0.

Criopreservación: Los especímenes fueron colocados en recipientes de vidrio estériles sin ninguna solución de preservación y conservadas a -70° C por 90 días. Previo a ser implantadas, fueron entibiadas colocando el recipiente de vidrio en un baño de agua a 37° C durante 10 minutos.

Azul tripán: En dos animales de cada grupo se administraron 15 mg/kg de azul tripán 0,4% (preparado en 0,81% de cloruro de sodio y 0,06% de fosfato de potasio, probado en cultivos celulares) (Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri) a través de la vena yugular externa 10 minutos antes del sacrificio con el propósito de evaluar la viabilidad del injerto.

Estudio morfológico: Todos los animales fueron sacrificados a los 30 días del implante. Inmediatamente antes del sacrificio, las ratas fueron anestesiadas con isoflurano 5 % y pentobarbital sódico intraperitoneal 20 mg / kg; luego fueron laparotomizadas y el injerto evaluado macroscópicamente.

Tres muestras para estudio microscópico fueron tomadas de cada espécimen: inmediatamente después de la ablación, inmediatamente antes del implante (al finalizar el periodo de preservación) y en el momento del sacrificio.

Los especímenes fueron fijados en formalina y coloreados con hematoxilina-eosina y analizados por un observador externo (sin conocimiento de la correlación entre grupo y método de preservación). Se utilizó un score de injuria histológica para evaluar la condición de la pared traqueal trasplantada: 0: pared normal; 1: lesiones aisladas del epitelio; 2: necrosis isquémica con o sin hemorragia de la lámina propia; 3: necrosis isquémica de la submucosa; y 4: necrosis isquémica del cartilago⁸.

Los injertos de los animales a quienes se administró azul tripán fueron coloreados solamente con eosina para evitar la eventual superposición de la hematoxilina con las células teñidas por el azul tripán.

El estudio estadístico se realizó empleando la Prueba T asumiendo varianzas desiguales. Un valor de P menor a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

No hubo muertes durante la experiencia.

Macroscopía: Todos los injertos obtenidos en el momento del sacrificio muestra-

ban la luz ocupada por granulomas, acompañados, en algunos casos, por la penetración del epiplón hacia la misma. Un injerto del grupo A y dos del grupo B presentaban material purulento en la luz.

Grupo	Posablación*	Preimplante	Sacrificio#
A	0,2	-	3,1
B	0,4	-	1,7
C	2	2	3
D	0,2	0,2	1,1

Tabla 1: score injuria histológica. Tráqueas no criopreservadas. *p menor 0.001 grupo C vs. grupos A, B y C. #p menor 0.001 grupos B y D vs. A y C.

Grupo	Posablación	Preimplante*	Sacrificio#
E	1,6	1,7	3,2
F	1,5	3	3,7
G	0,1	0,6	1,3
H	0,2	1	1

Tabla 2: Score injuria histológica. Tráqueas criopreservadas. *p menor 0.01 grupos G y H vs. grupos E y F. #p menor 0.01 grupos G y H vs. grupos E y F.

Los injertos no criopreservados que no fueron irrigados con Euro-Collins presentaban una gruesa capa fibrosa envolviendo los mismos, cartilagos levemente deformados y pérdida de la capacidad de elongación. Aquellos que recibieron Euro-Collins sólo mostraban adherencias laxas, los cartilagos se encontraban conservados y mantenían una adecuada elasticidad. En ninguno de los injertos criopreservados se observó fibrosis o adherencias firmes a los tejidos adyacentes.

Microscopía: Los especímenes obtenidos inmediatamente después de la ablación mostraron una estructura histológica conservada excepto en aquellos grupos que no recibieron Euro-Collins (grupos C, E y F; escores de 2; 1,6; y 1,5 respectivamente) ($p < 0.001$).

Las muestras procesadas inmediatamente antes del implante presentaban mayor número y severidad de lesiones en aquellos grupos que no fueron perfundidos con la solución de preservación. Entre los injertos criopreservados, los grupos G y H mostraron me-

nor daño histológico que los grupos E y F (0,6 y 1 vs. 1,7 y 3; respectivamente) ($p < 0.01$).

Los escores del material obtenido en el momento del sacrificio fueron: grupo A: 3,1; grupo B: 1,7; grupo C: 3; grupo D: 1,1; grupo E: 3,2; grupo F: 3,7; grupo G: 1,3 y grupo H: 1 ($p < 0.001$ grupos no criopreservados con Euro-Collins vs. grupos no criopreservados sin Euro-Collins; $p < 0.01$ grupos criopreservados con Euro-Collins vs. criopreservados sin Euro-Collins; $p = 0.37$ NS grupos no criopreservados con Euro-Collins vs. grupos criopreservados con Euro-Collins).

Los hallazgos en los especímenes más dañados fueron necrosis o desaparición del epitelio y la submucosa, infiltrado inflamatorio crónico en el tejido colágeno remanente, áreas de necrosis del cartilago con focos de histiocitos xantomizados (citoplasma espumoso) y hemorragia extensa. En un animal del grupo A y en dos del grupo B se observó la presencia de infiltrado inflamatorio polimorfonuclear.

Azul tripán: En los especímenes obtenidos de los animales tratados con azul tripán no se objetivó la presencia de colorante en la estructura cartilaginosa ni en el tejido conectivo vecino.

Discusión

El resultado satisfactorio obtenido con el uso de elementos criopreservados en cirugía valvular cardíaca¹⁹⁻²³ y en hemoderivados²⁴⁻²⁷ permite implementar esta técnica en trasplante de tráquea con el propósito de aumentar la disponibilidad de órganos²⁸; más aún, la criopreservación prolongada (mayor a 30 días) disminuiría la inmunogenicidad del injerto^{29,30}, de esta manera, se evitaría la necesidad de inmunosupresión, lo que mejoraría la calidad de vida del paciente trasplantado y eliminaría la contraindicación al trasplante en aquellos pacientes con neoplasias de la vía aérea²⁸.

Observamos que la preservación con Euro-Collins es superior a la preservación sin ella luego de 24 horas de preservación a 4° C, tanto en tráqueas criopreservadas o no; del mismo modo, en tráqueas congeladas inmediatamente después de la ablación, la preservación con Euro-Collins es superior a la preservación sin Euro-Collins, sin embargo, los injertos no criopreservados tratados o no con Euro-Collins e implantados inmediatamente luego de ablacionados, mostraron diferencias leves; sorprendentemente en

estos grupos (A y B), los scores fueron peores que en injertos con tiempo de preservación más prolongado. Probablemente esto se deba a la infección que sufrieron algunos animales de estos grupos.

Elegimos preservar los injertos durante 24 horas a 4° C debido a que ha sido reportado que la tráquea tolera períodos de isquemia de hasta 15 horas¹³.

Buscando un método simple de preservación traqueal, decidimos la congelación, ya que ha sido demostrado en injertos arteriales que la congelación no controlada es tan eficaz como la congelación progresiva controlada³¹. Más aún, Inutsuka y colaboradores reportan la criopreservación traqueal sin ningún preservativo¹⁴. En nuestro modelo, si bien no utilizamos ninguna solución crioprotectora al congelar los segmentos de tráquea, aquellos previamente tratados con Euro-Collins mostraron menor daño histológico luego de implantados.

La exclusión del azul tripán ha sido usada para determinar la viabilidad celular en varios órganos³²⁻³⁴. Las células no viables captan el azul tripán, mientras que las células viables no lo hacen³⁵. La ausencia de captación de azul tripán, en los especímenes tratados con el colorante, señala la integridad de las células cartilaginosa y del tejido conectivo vecino.

No intubamos a los donantes para evitar posibles lesiones de la tráquea y prevenir la formación de edema.

Siguiendo la observación de Sobin³⁶ y Blanding³⁷ sobre los pedículos vasculares y la distribución arterial en conejos, perros y ratas similar al hombre, decidimos canular la aorta y clampearla al nivel del diafragma para favorecer la irrigación traqueal a través de las ramas esofágicas, bronquiales, subclavas y tiroideas³⁸.

Ha sido descrito el implante de tráquea en epiplón con el propósito de revascularizar el injerto con vasos de neoformación provenientes del omento para luego movilizar conjuntamente el injerto y su envoltura hacia la posición final ortotópica (región cervical o torácica)³⁹. Delaere⁴ reporta buenos resultados con esta técnica, sin embargo, la formación de granulomas intraluminales que observamos en nuestro estudio, sugiere que la misma no es una técnica conveniente.

La preservación con Euro Collins es superior a la preservación sin Euro Collins tanto en tráqueas criopreservadas como no criopreservadas.

Los injertos criopreservados presentan lesiones leves aunque más severas que aquellos no criopreservados.

La criopreservación es una estrategia válida para la obtención de injertos traqueales.

Luego de la irrigación con Euro Collins es posible preservar tráqueas hasta 24 horas a 4° C.

Bibliografía

- Moriyama S, Shimizu N, Teramoto S. Experimental tracheal allotransplantation using omentopexy. *Transplant Proc* 21: 2596-2600, 1986.
- Nakanishi R, Shirakusa T, Takachi T. Omentopexy for tracheal autografts. *Ann Thorac Surg* 57: 841-845, 1994.
- Macchiarini P, Machmanian G, Montréville V et al: Experimental tracheal and tracheoesophageal allotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110 (4): 1037-1046, 1995.
- Delaere P, Ziyang Liu, Hermans R et al: Experimental tracheal allograft revascularization and transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110 (3): 728-737, 1995.
- Delaere P, Ziyang Liu, Pauwels P et al: Experimental revascularization of airway segments. *Laryngoscope* 104: 736-740, 1994.
- Davreux Ch, Chu B, Waddell T, et al: Improved tracheal allograft viability in immunosuppressed rats. *Ann Thorac Surg* 55: 131-134, 1993.
- Rose K, Sesterhenn K, Wustrow F.: Tracheal allotransplantation in man. *The Lancet* 1: 433-436, 1979.
- Macchiarini P, Lenot B, Montréville V et al: Heterotopic pig model for direct revascularization and venous drainage of tracheal allografts. *J. Thorac Cardiovasc Surg* 108 (6): 1066-1075, 1994.
- Takachi T, Shirakusa T, Shiraishi T, et al: Experimental carinal autotransplantation and allotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110 (3): 762-767, 1995.
- Messineo A, Filler R, Bahoric B et al. Successful tracheal autotransplantation with a vascularized omental flap. *J Pediatr Surg* 26 (11): 1296-1300, 1991.
- Lenot B, Macchiarini P, Darteville P: Tracheal Transplantation: an experimental technique with revascularization and venous drainage. *Transplantation Proceedings* 27 (2): 1684-1685, 1995.
- Date M. Experimental studies on canine tracheal preservation. *J Jpn Surg Soc* 91: 1740-1748, 1990.
- Macchiarini P, Mazmanian G, de Montréville VT et al. Maximal preservation time of tracheal allografts. *Ann Thorac Surg* 60: 1597-1604, 1995.
- Inutsuka K, Kawahara K, Takachi T et al. Reconstruction of trachea and carina with immediate or cryopreserved allo-

- grafts in dogs. *Ann Thorac Surg* 62: 1480-1484, 1996.
15. Messineo A, Filler R, Smith Ch et al. Cryopreservation of pig trachea. *Pediatr Surg Int* 8: 476-479, 1993.
 16. Messineo A, Filler R, Joseph T et al. Tracheoplasty without stent, using preshaped cryopreserved cartilage allografts in neonatal pigs. *J Ped Surg* 29 (5): 697-700, 1994.
 17. Torres Rodriguez T, Santill Doherty P, Sotres A et al. Crio-preservación de tráquea. Estudio experimental. *Rev Guat Cirug* 2 (1): 18-22, 1993.
 18. Boglione M, Asprea M, Rubio R et al. Presentación de un modelo experimental de trasplante de tráquea. *Rev Cir Infantil* 7 (1): 7-12, 1997.
 19. Niwaya K, Knott-Craig Ch, Lane M et al. Cryopreserved homograft valves in the pulmonary position: risk analysis for intermediate-term failure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 117: 141-147, 1999.
 20. Kay H, Ross DN. Fifteen years' experience with the aortic homograft: the conduit of choice for right ventricular outflow tract reconstruction. *Ann Thorac Surg* 40: 360-364, 1985.
 21. Matsuki O, Okita Y, Almeida RS et al. Two decades' experience with aortic valve replacement with pulmonary autograft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 95: 705-711, 1988.
 22. Kirklin JW, Blackstone EH, Maehara T et al. Intermediate-term fate of cryopreserved allograft and xenograft valved conduits. *Ann Thorac Surg* 44: 598-606, 1987.
 23. Hawkins JA, Bailey WW, Dillon T et al. Midterm results with cryopreserved allograft valved conduits from the right ventricle to the pulmonary arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg* 104: 910-916, 1992.
 24. Khuri S, Healey N, Mac Gregor H et al. Comparison of the effects of transfusions of cryopreserved and liquid-preserved platelets on hemostasis and blood loss after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 117: 172-184, 1999.
 25. Melaragno AJ, Carciere R, Feingold H et al. Cryopreservation of human platelets using 6 % dimethylsulfoxide and storage at -80° C: effects of 2 years of frozen storage at -80° C and transportation in dry ice. *Vox Sang* 49: 245-258, 1985.
 26. Owens M, Cimino C, Donnelly J. Cryopreserved platelets have decreased adhesive capacity. *Transfusion* 31: 160-163, 1991.
 27. Schiffer CA, Aisner J, Wiemik PH. Frozen autologous platelet transfusion for patients with leukemia. *N Engl J Med* 299: 7-12, 1978.
 28. Mukaida T, Shimizu N, Aoe M et al. Experimental study for tracheal allotransplantation with cryopreserved grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 116: 262-266, 1998.
 29. Yokomise H, Inui K, Wada H et al. Long term cryopreservation can prevent rejection of canine tracheal allografts with preservation of graft viability. *J Thorac Cardiovasc Surg* 111: 930-934, 1996.
 30. Tojo T, Niwaya K, Sawabata N et al. Tracheal allogeneic immunoresponse is reduced by cryopreservation: canine experiment. *Transplant Proc* 28 (3): 1814-1815, 1996.
 31. Capocasale E, Carlotella C, Olivetti G et al. Cryopreservation of human arteries: controlled versus uncontrolled freezing-rate. In *Proceedings of the XXXI World Congress of the International College of Surgeons*, Monduzzi Ed, Bologna Italy, 1998, pp 199-202.
 32. Ganey P, Carter L, Mueller R et al. Doxorubicin toxicity in perfused rat heart: decreased cell death at low oxygen tension. *Circ Res* 68: 1610-1613, 1991.
 33. Koo J, Chang T. Secretion of erythropoietin from microcapsulated rat kidney cells: preliminary results. *Int J Artif Organs* 16: 557-560, 1993.
 34. D'Armini A, Roberts Ch, Griffith P et al. When does the lung die? I. Histochemical evidence of pulmonary viability after "death". *J Heart Lung Transplant* 13: 741-747, 1994.
 35. Hugh J. Dye exclusion tests for cell viability. In Kruse P, Patterson M, eds. *Tissue culture methods and applications*. New York: Academic Press, 1973, pp 406-408.
 36. Sobin S. The microcirculation of the tracheal mucosa. *Angiology* 14: 165-168, 1963.
 37. Blanding J. The gross morphology of the arterial supply to the trachea of the rabbit. *The Anatomical Record* 148: 611-615, 1964.
 38. Ferreira L. Irrigación de la tráquea. *Rev Argent Cirug* 19: 472-474, 1970.
 39. Delaere PR, Liu ZY, Feenstra L. Tracheal autograft revascularization and transplantation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 103: 215-221, 1994.
- Trabajo presentado en el 33º Congreso Argentino de Cirugía Pediátrica, Buenos Aires, 1999.

Dr. M. Boglione
Pichincha 1850
(1245) Capital
Argentina