

Análise da relação fenótipo/genótipo HLA no transplante renal

S Cunha¹, M Dias², M Sousa¹ & J Condeço⁴

^{1,4} Área Científica de Análises Clínicas e Saúde Pública, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Vila Nova de Gaia, PORTUGAL.

² Laboratório de Genética Molecular, Centro de Histocompatibilidade do Norte, EPE, Porto, PORTUGAL.

³ Centro de Investigação de Saúde e Ambiente, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Vila Nova de Gaia, PORTUGAL.

⁴ Centro Regional de Sangue do Porto, Instituto Português do Sangue, IP, Porto, PORTUGAL.

RESUMO

A melhor opção terapêutica na maioria dos pacientes em fase final de insuficiência renal é o transplante renal (TR). O estudo da compatibilidade do TR é feito através da caracterização dos antígenos leucocitários humanos (HLA).

Neste estudo analisou-se a relação fenótipo/genótipo HLA no TR em 5 pares dador receptor. Fenotipicamente os pares foram iguais, no entanto, genotipicamente verificou-se a existência de um discordante. Independentemente deste achado, nenhum dos receptores desenvolveu anticorpos específicos contra o enxerto, sugerindo que a relação fenótipo/genótipo HLA não é causa única e indiscutível na rejeição do enxerto.

Palavras-chave: Transplante renal, HLA, fenótipo HLA, genótipo HLA.

ABSTRACT

Renal transplantation is the treatment of choice for end stage renal disease. Major genetic contributors to immunological acceptance of the graft are human leukocyte antigen (HLA) genes.

The objective of this study was to verify the HLA phenotype/genotype correlation and its consequence on the transplantation outcome.

This study analyzed 5 donor/recipient pairs. Phenotypically the pairs were equal, however, genotypically has been verified the existence of a discordant pair. Regardless of this finding, none of the recipients developed antibodies against the graft, suggesting that the HLA phenotype/genotype correlation is no single cause in graft rejection.

Keywords: Renal transplantation, HLA, HLA phenotype, HLA genotype.

1. INTRODUÇÃO

A região do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) abrange cerca de 4000 kilobases de ácido desoxirribonucleico (DNA) e codifica proteínas de superfície das células de tecidos que são ricamente expressas nos leucócitos, sendo por isso denominados os antígenos MHC por HLA (Alakulppi, 2008; Choo, 2007; Clark and Unsworth, 2010; Trivedi, et al., 2007).

O sistema HLA é codificado por duas famílias de genes altamente polimórficos, localizados no braço curto do cromossoma 6 (Alakulppi, 2008; Choo, 2007; Howell, et al., 2010; Mansour, et al., 2006; Seyhun et al., 2007; Trivedi, et al., 2007). Os polimorfismos dão-se devido à variação alélica que é mantida na população com acentuadas diferenças inter-individuais na resposta imunitária a antígenos estranhos (Howell, et al., 2010). Os genes HLA são geralmente divididos em duas classes principais. A classe I inclui os antígenos HLA A, B e C, e a classe II os antígenos HLA DP, DQ e DR (Alakulppi, 2008; Choo, 2007; Tinckam and Chandraker, 2006; Trivedi, et al., 2007). Este sistema exerce um papel fundamental na regulação da resposta imune, através do reconhecimento de antígenos, no seu processamento e na sua apresentação aos linfócitos CD4 através da sua classe II ou aos linfócitos CD8 pela sua classe I (Howell, et al., 2010; Morais, et al., 2008; Trivedi, et al., 2007).

Como consequência disso, também constitui uma barreira imunológica, que deve ser evitada e/ou superada em casos de transplantação, uma vez que os antígenos HLA são expressos em todas as células nucleadas, em todos os órgãos (Clark and Unsworth, 2010; Howell, et al., 2010).

Os genes HLA apresentam-se assim como uns dos maiores contribuintes genéticos para a aceitação imunológica do enxerto (Alakulppi, 2008; Trivedi, et al., 2007). Tendo sido claramente demonstrado que o aumento da sobrevivência de um rim transplantado é conseguido com uma melhor adequação HLA entre o dador e o receptor (Trivedi, et al., 2007).

O TR representa a melhor opção terapêutica para a maioria dos pacientes em fase final de insuficiência renal, já que aumenta a esperança e a qualidade de vida do doente e reduz os custos económicos em relação ao tratamento por diálise a longo prazo (Alakulppi, 2008; BM and JL, 2007; Jeldres, et al., 2009; Kokthong, et al., 2005; Seyhun, et al., 2007; Vamos, et al., 2009). Foi demonstrado que existem diferenças significativas no acesso ao TR, indicando que factores não-médicos, tais como dados demográficos e socioeconómicos, bem como as características psicossociais, influenciam a probabilidade de receber um transplante (Vamos, et al., 2009).

Um TR para ser bem sucedido exige a melhor correspondência imunogenética possível entre o dador e o receptor (Orsenigo, et al., 2005). Ocorrendo a perda de um número significativo de enxertos renais secundariamente à cirurgia e a complicações imunológicas (Orsenigo, et al., 2005). A diabetes e a idade dos dadores são consideradas factores prognósticos independentes, que afectam a sobrevida do enxerto renal após o transplante. Enquanto os mesmos factores mas relativamente ao receptor afectam a sobrevida do mesmo (Orsenigo, et al., 2005). Não obstante os contínuos avanços nas terapias imunossupressoras e de apoio, existem diversos factores que influenciam o sucesso do TR (Avihingsanon et al., 2005; Shrestha and Haylor, 2007):

- **Factores relacionados com o dador.** Tempo prolongado de isquemia, idade, sexo e não compatibilidade HLA;
- **Factores relacionados com o receptor.** Idade, duração do período de diálise e sensibilidade (anticorpos anti-HLA);
- **Factores específicos.** Funcionamento deficiente do enxerto (*Delayed graft function*), rejeição aguda, infecções virais, inibidores de nefrotoxicidade da calcineurina, recorrência de uma doença primária e microangiopatia trombótica de novo;
- **Factores não específicos.** Diabetes de novo, hipertensão arterial, agentes nefrotóxicos e incumprimento da terapia imunossupressora.

Em muitos centros mundiais, o TR só é considerado se (Alakulppi, 2008; Lieber, et al., 2007; Meng, et al., 2009; Rodriguez, et al., 2007): (i) o receptor e o dador são do mesmo grupo sanguíneo ABO; (ii) o receptor não podem ter sido induzidos por transfusões sanguíneas, gravidezes e transplantes, já que estes representam um importante factor de risco para o aumento da incidência da rejeição hiperaguda/aguda, rejeição crónica e perda prematura do enxerto; (iii) há suficiente semelhança HLA A, B e DR entre o par dador/receptor.

Os laboratórios de imunologia e genética molecular são assim essenciais e parte integrante dos programas de TR. Auxiliam os clínicos na avaliação imunológica dos receptores do TR e na selecção do par dador/receptor com menor risco de falência imunológica, bem como na fase pós-transplante (Choo, 2007; Seyhun, et al., 2007; Susal and Opelz, 2007). A tipagem HLA, o *crossmatch* e a pesquisa de anticorpos pré e pós-transplante constituem as análises mais efectuadas no caso de um TR (Choo, 2007; Seyhun, et al., 2007).

Actualmente a tipagem HLA é realizada tanto por métodos serológicos como por métodos de biologia molecular, no entanto estes últimos começam a substituir os primeiros (Choo, 2007; Ferrer, et al., 2005; Middleton, 2005; Mishra, et al., 2006; Seyhun, et al., 2007; Shankarkumar, et al., 2008). Pois, a utilidade dos testes serológicos convencionais tem sido limitada pela disponibilidade de soros específicos para os múltiplos alelos (Middleton, 2005; Shankarkumar, et al., 2008).

Segundo a Sociedade Portuguesa de Transplantação (SPT), em 2008 realizaram-se cerca de 500 transplantes renais em Portugal, sendo que a unidade de transplantação com maior número de transplantes realizado, 167 no total, foi a unidade dos Hospitais da Universidade de Coimbra, em que 160 dos receptores receberam um rim de um dador cadáver, enquanto 7 foram transplantados com um rim de um dador vivo (Macário, et al., 2009).

Através do registo da SPT, sabe-se ainda que, em 2008, 57 % dos receptores eram do sexo masculino, sendo a média de idade à data do TR de 46,4 anos (Macário, et al., 2009).

Relativamente à influência da idade na sobrevida do enxerto, a SPT concluiu que a idade é um factor importante, sendo que os receptores com mais de 60 anos têm um período menor de sobrevida do enxerto (Macário, et al., 2009)

Em 2008, 356 receptores renais estavam sujeitos a terapêutica substitutiva prévia, sendo que 82 % realizava hemodiálise (Macário, et al., 2009)

Por estes dados verifica-se a necessidade de optimização dos enxertos. O estudo do painel reactivo dos anticorpos (PRA) é um meio de triagem dos pacientes que aguardam TR (Hajeer, 2006, Lieber, et al., 2007, Nwakanma et al., 2007). É usado para determinar a presença de anticorpos circulantes para HLA A, B e DR no soro do receptor contra um painel aleatório de linfócitos. O resultado do PRA é normalmente apresentado como a percentagem de reactividade do painel (ou seja, o número de poços com reactividade positiva, dividido pelo número total de poços testados x 100) (Lieber, et al., 2007, Nwakanma, et al., 2007). Quanto menor a percentagem maior a probabilidade de minimizar as complicações e os resultados adversos que podem prejudicar a função a longo prazo do enxerto, e maximizar o aproveitamento de órgãos (Alakulppi, 2008; Jeldres, et al., 2009)

Este trabalho tem como principal objectivo a verificação da relação fenótipo genótipo HLA e a sua consequência no resultado do transplante

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Tipo de Estudo

Estudo observacional, transversal, descritivo

2.2 População e Amostra

A população em estudo englobou todos os receptores de TR registados no Centro de Histocompatibilidade do Norte (CHN).

A amostra incluiu os pares dador receptor com fenotipagem HLA B* com registo do fenótipo HLA B*15 ou HLA B*50, até se atingir o total de 24 amostras. Excluíram-se todas as unidades de observação que não possuíam amostra ou em que não se obtiveram os resultados da amplificação.

2.3 Instrumentos

A avaliação do grau de pureza do DNA foi efectuada no espectrofotómetro Nanodrop® 8000.

As genotipagens HLA B*15 e HLA B*50 foram realizadas a partir de amostras de DNA congeladas, que foram amplificadas por *Sequence-Based Typing* (SBT) no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 e sequenciadas no ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer. A análise das sequências obtidas foi efectuada no programa *Assign SBT version 3.5.1.42*.

Os dados relativos ao PRA foram obtidos a partir dos registos da base de dados do CHN - B Simple LAB.

2.4 Procedimentos

Seleccionaram-se aleatoriamente os 12 primeiros receptores renais registados a partir das listagens com fenotipagem HLA B*15 ou HLA B*50 obtidas a partir do B Simple LAB. De seguida, procedeu-se à pesquisa dos dadores correspondentes.

Após concluído o processo de selecção das unidades amostrais, procedeu-se à descongelação das amostras, realizada no frigorífico entre 2 e 6 °C.

Em seguida fez-se a quantificação do DNA de cada amostra, segundo o protocolo do laboratório de Genética Molecular (GM) do CHN (Dias, 2009).

Utilizou-se a metodologia SBT para genotipagem HLA, já que é o método mais abrangente para a caracterização de polimorfismos do gene HLA. Várias famílias de alelos cujos produtos HLA partilham marcadores serológicos codificam distintas variantes moleculares. Assim sendo, os mesmos produtos HLA podem ser distinguidos por técnicas de biologia molecular de alta resolução (Mansour, et al., 2006; Shankarkumar, et al., 2008), como é o caso da SBT. Esta técnica envolve a amplificação específica de regiões codificantes dos genes HLA e a sequenciação dos amplicões (Shankarkumar, et al., 2008). Recorrendo a *primers* marcados fluorescentemente, a amplificação do grupo específico é realizada para limitar o número de sequências alélicas, que a não ser feita, permitiria que DNA de ambos os haplótipos estivesse presente. A grande vantagem desta técnica é a precisão, pois é a única que detecta directamente a sequência de nucleótidos de um alelo, permitindo assim um alinhamento exacto (Middelton, 2005).

Na etapa seguinte procedeu-se à amplificação, à visualização dos resultados e à sequenciação das amostras, de acordo com o protocolo "Protrans Domino Stones HLA SBT" (Dias, 2009).

Os dados do PRA pré e pós-transplante de cada receptor foram obtidos através da consulta do B Simple LAB.

2.5 Ética

Os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do CHN e com a Declaração de Helsinquia (2000).

3. RESULTADOS

3.1 Selecção das amostras

Da selecção inicial de 24 amostras, não foi possível encontrar 4 amostras de dador e duas de receptor. Ficaram assim para análise 18. A estas analisou-se o grau de pureza do DNA (Quadro 1).

Quadro 1: Avaliação do grau de pureza das amostras seleccionadas.

Amostra	Concentração de DNA (ng/ μ L)	260/280*
1	95,65	1,79
2	87,98	1,13
3	107,4	1,80
4	21,40	1,48
5	124,0	1,84
6	379,1	1,58
7	295,6	1,85
8	357,2	1,84
9	95,35	1,48

Amostra	Concentração de DNA (ng/ μ L)	260/280
10	15,59	1,41
11	149,9	1,82
12	207,3	1,83
13	147,1	1,82
14	124,2	1,86
15	175,3	1,88
16	164,0	1,87
17	152,3	1,84
18	43,04	1,38

Assim após a selecção inicial das amostras e do seu processamento, verificou-se a perda de algumas unidades amostrais estando as causas que conduziram à sua exclusão apresentadas no Gráfico 1.

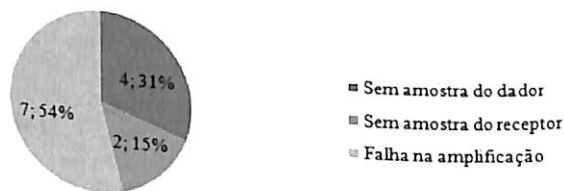
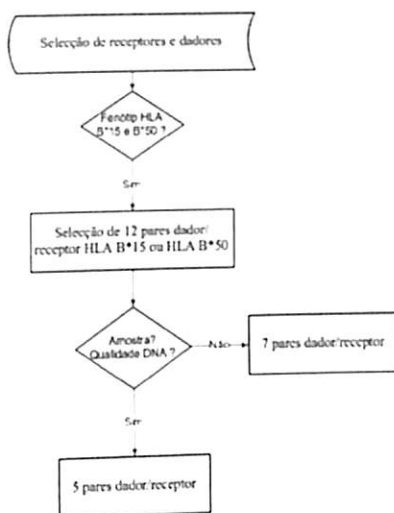


Gráfico 1: Causas que levaram à exclusão de algumas amostras.

O Fluxograma 1 sintetiza o processo de seleção das amostras.



Fluxograma 1: Processo de seleção das amostras.

3.2 Análise das características fenotípicas e genotípicas dos pares dador/receptor

O Quadro 2 expõe as características fenotípicas e genotípicas dos pares dador/receptor analisados bem como se houve rejeição do enxerto.

Quadro 2: Fenótipo e genótipo do pares dador/receptor.

Par dador/receptor	Fenótipo HLA B ⁺ do dador	Genótipo HLA B ⁺ do dador	Fenótipo HLA B ⁺ do receptor	Genótipo HLA B ⁺ do receptor	Rejeição
1	50	5001	50	5001	Não
2	50	5001	50	5001	Não
3	50	5001	50	5001	Não
4	15	1517	15	1503	Não
5 ^b	15	1501	15	1501	Não

^b Receptor bitransplantado, sendo que o houve rejeição do primeiro TR.

3.3 Avaliação do PRA pré e pós-transplante dos receptores

O Quadro 3 resume a avaliação do PRA dos receptores antes e depois do TR.

Receptor	PRA pré-transplante (%)	PRA pós-transplante (%)
1	2	2
2	11	2
3	0	0
4	0	0
5	9	4

Quadro 3: PRA pré e pós-transplante dos receptores.

4. DISCUSSÃO

Na preparação e decurso da realização do estudo surgiram algumas limitações ao desenvolvimento e leituras a obter deste, e que se relacionaram com o baixo número de unidades amostrais que foi possível seleccionar.

Em primeiro lugar o número de amostras a analisar foi limitado a 24 amostras (um kit) por questões de natureza operacional e logística.

Este número sofreu novo decréscimo devido à perda importante de amostras, o que poderá estar relacionado com vários factores:

- O nível elevado de manuseamento das mesmas que, tendo sido utilizadas em diversos estudos, se traduziu em contaminação e perda das propriedades físico-químicas;
- As diferenças significativas entre as técnicas de extracção de DNA usadas anteriormente e as usadas no presente. Isto porque no conjunto de amostras seleccionadas encontravam-se algumas com mais de 10 anos. Nessa altura a técnica de extracção preferencialmente utilizada denomina-se por *Salting-out*. Esta técnica, para além de ser integralmente manual, recorre a reagentes preparados no próprio laboratório em que a estabilidade e o grau de pureza não são tão fiáveis como os kits comerciais usados nos métodos de extracção automática, utilizados no presente, como é o caso do QIACube®, do BioRobot® M48 e do ABBOTT® m2000sp;
- Todas as amostras seleccionadas encontravam-se congeladas a -70 °C, estando as mais antigas conservadas em água ultra-pura, enquanto as mais recentes, e dependendo do método de extracção, estão conservadas em soluções tampão. Estas soluções fornecem uma maior estabilidade ao soluto. O solvente de armazenamento das amostras pode assim também ser uma outra causa para a perda de integridade destas
- Nem todas as amostras possuem o grau de pureza recomendado como pode ser observado no Quadro 1. Um valor abaixo do intervalo 1,8 e 2,0 pode indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem nestes comprimentos de onda, podendo ter invalidado assim 4 pares dador/receptor, correspondentes às amostras 3, 4, 5, 6, 9, 10, 13 e 14.
- Relativamente à concentração óptima do DNA, esta deve encontrar-se entre 50 e 100 ng/μL. Pode constatar-se (Quadro 1) que as amostras 4, 10 e 18 não cumprem essa premissa. As amostras 4 e 10 falharam na fase de amplificação, no entanto, a amostra 18 concluiu com êxito todo o processo de amplificação e sequenciação.

O Quadro 2 apresenta as características fenotípicas e genotípicas dos 5 pares dador/receptor objecto de estudo neste trabalho. Fenotipicamente todos os pares foram iguais, no entanto genotipicamente no par 4 existe uma discordância: o dador possui o genótipo HLA B* 1517 enquanto o receptor é um HLA B* 1503. Apesar disto, o receptor não rejeitou até ao momento o rim transplantado, tal como nenhum dos outros quatro receptores.

Como o número de amostras é bastante reduzido, pode apenas evidenciar-se que neste estudo a relação fenótipo/genótipo HLA entre dador e receptor permanece ambígua. Pela análise dos resultados para o par 4 pode inferir-se que essa relação não é causa única e indiscutível na rejeição do enxerto. Como já foi mencionado anteriormente, a rejeição não depende só do sistema HLA, mas também, de uma série de outros factores médicos relacionados com o dador, com o receptor, com factores específicos e inespecíficos, e outros.

Os valores do PRA pós-transplante em todos os receptores mantiveram-se ou diminuíram, o que pode indicar a efectividade da terapêutica imunossupressora dada a estes doentes e/ou o bom emparelhamento imunogenético obtido. Mesmo no par 4 (que se apresentava como o mais provável a desenvolver anticorpos pós-transplante, uma vez que há a discordância genotípica mencionada anteriormente) isso não ocorreu. Pode então concluir-se que no caso de uma correspondência fenotípica entre o dador e o receptor, embora haja uma não concordância genotípica, isso não se traduz num risco imediato para o insucesso do TR.

5. CONCLUSÕES

Ocorreu uma perda acentuada de amostras devido a condições técnicas que deverão ser corrigidas, já que a técnica utilizada – SBT requer amostras de elevada qualidade.

A técnica SBT permitiu a alta resolução dos alelos HLA B*15 e HLA B*50, o que possibilitou a verificação de que um *mismatch* entre o genótipo do dador e receptor não é aparentemente um risco para o insucesso do transplante.

Os resultados quanto ao sucesso do enxerto não são conclusivos devendo ser realizados estudos de maior amplitude (em termos de número e extensão temporal) de forma a ultrapassar as limitações agora encontradas.

6. REFERÊNCIAS

- Alakulppi, N. (2008) *Genetic aspects of outcome in kidney transplantation – cytokine and thrombosis associated candidate genes and gene expression biomarkers*. University of Helsinki, Helsinki.
- Avihingsanon, Y., Ma, N., Pavlakis, M., Chon, W. J., Uknis, M. E., Monaco, A. P., ... Strom, T. B. (2005) On the intraoperative molecular status of renal allografts after vascular reperfusion and clinical outcomes. *J Am Soc Nephrol*, 16(6), 1542-1548.
- BM, S., and JL, H. (2007). Factors Influencing Long-term Outcomes following Renal Transplantation: A Review. *J.Nepal Med Assoc*. 46(167), 136-142.
- Choo, S. Y. (2007). The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J*, 48(1), 11-23.
- Clark, B., and Unsworth, D. J. (2010). HLA and kidney transplantation. *J Clin Pathol*, 63(1), 21-25.
- Dias, M. A. (2009). *Manual de procedimentos do laboratório de Genética Molecular*. Laboratório de Genética Molecular. Centro de Histocompatibilidade do Norte, EPE. Porto.
- Ferrer, A., Fernández, M. E., and Nazabal, M. (2005). Overview on HLA and DNA typing methods. *Biocologia Aplicada*, 22(2), 91-101.
- Hajeer, A. H. (2006). Panel Reactive Antibody test (PRA) in renal transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 17(1), 1-4.
- Howell, W. M., Carter, V., and Clark, B. (2010). The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. *J Clin Pathol*, 63(5), 387-390.
- Jeldres, C., Cardinal, H., Ducloux, A., Shariat, S. F., Suardi, N., Capitanio, U., ... Karakiewicz, P. I. (2009). Prediction of delayed graft function after renal transplantation. *Can Urol Assoc J*, 3(5), 377-382.
- Koktathong, K., Vejbaesya, S., Bejrachandra, S., and Pattanapanyasat, K. (2005). Flow cytometric crossmatch for kidney transplantation. *J Med Assoc Thai*, 88(6), 769-774.
- Lieber, S. R., Perez, F. V., Tabossi, M. R., Persoli, L. B., Marques, S. B., Mazzali, M., ... de Souza, C. A. (2007). Effect of panel-reactive antibody in predicting crossmatch selection of cadaveric kidney recipients. *Transplant Proc*, 39(2), 429-431.
- Macário, F., Filipe, R. A., and Sarmento, A. M. (2009). *Registo Português de Transplantação Renal 1980-2008*. Paper presented at the Reunião da Sociedade Portuguesa de Transplantação, Curia.
- Mansour, A. G., Ghaffari, S. H., Alimoghadam, K., and Ghavamzadeh, A. (2006). Typing of HLA Class I by Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotides Primer (PCR-SSOP) Technique in Iranian Cord Blood Donors. *Iran J Immunol*, 3(2), 95-98.
- Meng, H. L., Jin, X. B., Li, X. T., Wang, H. W., and Lu, J. J. (2009). Impact of human leukocyte antigen matching and recipients' panel reactive antibodies on two-year outcome in presensitized renal allograft recipients. *Chin Med J (Engl)*, 122(4), 420-426.
- Middelton, D. (2005). HLA Typing from Serology to Sequencing Era. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 4(2), 53-66.
- Mishra, M. N., Mani, H., Saxena, V. K., and Gupta, M. K. (2006). Molecular tissue typing in renal transplantation: Initial experience from a tertiary care Naval Hospital. *Indian Journal of Human Genetics*, 12(3).

- Morais, A., Alves, H., Lima, B., Delgado, L., Goncalves, R., and Tafulo, S. (2008). HLA class I and II and TNF-alpha gene polymorphisms in sarcoidosis patients. *Rev Port Pneumol*, 14(6), 727-746.
- Nwakanma, L. U., Williams, J. A., Weiss, E. S., Russell, S. D., Baumgartner, W. A., and Conte, J. V. (2007). Influence of pretransplant panel-reactive antibody on outcomes in 8,160 heart transplant recipients in recent era. *Ann Thorac Surg*, 84(5), 1556-1562; discussion 1562-1553.
- Orsenigo, E., Socci, C., Carlucci, M., Zuber, V., Fiorina, P., Gavazzi, F., . . . Staudacher, C. (2005). Multivariate analysis of factors affecting patient and graft survival after renal transplant. *Transplant Proc*, 37(6), 2461-2463.
- Rodriguez, L. M., Paris, S. C., Arbelaez, M., Cotes, J. M., Susal, C., Torres, Y., and Garcia, L. F. (2007). Kidney graft recipients with pretransplantation HLA CLASS I antibodies and high soluble CD30 are at high risk for graft loss. *Hum Immunol*, 68(8), 652-660.
- Seyhun, Y., Karahan, G., Kekik, C., Tozkir, H., Usta, S., Oguz, F., and Carin, M. (2007). *Quality control program for HLA antigen/allele typing and antibody screening tests*. Paper presented at the The First International Proficiency Testing Conference, Sinaia, România.
- Shankarkumar, U., Pawar, A., and Ghosh, K. (2008). Implications of HLA sequence-based typing in transplantation. *J Postgrad Med*, 54(1), 41-44.
- Shrestha, B. M., and Haylor, J. L. (2007). Factors influencing long-term outcomes following renal transplantation: a review. *JNMA J Nepal Med Assoc*, 46(167), 136-142.
- Susal, C., and Opelz, G. (2007). Options for immunologic support of renal transplantation through the HLA and immunology laboratories. *Am J Transplant*, 7(6), 1450-1456.
- Tinckam, K. J., and Chandraker, A. (2006). Mechanisms and role of HLA and non-HLA alloantibodies. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1(3), 404-414.
- Trivedi, V. B., Dave, A. P., Dave, J. M., and Patel, B. C. (2007). Human leukocyte antigen and its role in transplantation biology. *Transplant Proc*, 39(3), 688-693.
- Vamos, E. P., Novak, M., and Mucsi, I. (2009). Non-medical factors influencing access to renal transplantation. *Int Urol Nephrol*, 41(3), 607-616.