

Método rápido para triagem da citotoxicidade geral parte II Foto-toxicidade

A high-throughput screening method for general cytotoxicity part II Phototoxicity

Amilcar Roberto^{*1}, Paulo Pliças Caetano¹, Anna-Karin Roberto²

¹ Laboratório de Toxicologia Experimental Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Avenida do Campo Grande 376, 1749-026 Lisboa, Portugal.

² Uppsala University, P.O. Box 256, SE - 751 05 Uppsala, Sweden.

Resumo

Um método previamente desenvolvido destinado a fazer a triagem rápida e o escalonamento da toxicidade geral exercida por agentes físicos e químicos tendo como modelo o *Saccharomyces cerevisiae* é usado para estudar os efeitos da radiação UVB de banda estreita (UVB-nb). As condições de experimentação para avaliar os efeitos tóxicos expressos na forma de inibição do crescimento foram estabelecidas na primeira parte deste trabalho. A segunda parte trata da toxicidade geral induzida pela radiação ultravioleta B banda estreita (311-312 nm) (UVB-nb). Concentrações celulares conhecidas de levedura foram expostas a 550 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ de UVB-nb por tempos diferentes e a proliferação comparada com grupos de controlo não irradiados. Os resultados demonstraram que os efeitos na proliferação produzidos por exposição a radiação UVB-nb até trinta minutos quando comparados com os controlos não tinham significado estatístico.

Palavras-chave: Modelo *Saccharomyces cerevisiae*; rastreio da citotoxicidade, inibição do crescimento pela radiação UVB; método de alto rendimento.

Abstract

A high-throughput assay intended for screening and ranking the general toxicity of physical or chemical agents based on a *Saccharomyces cerevisiae* model previously developed is used to study the effects of radiation ultraviolet B narrow band (311-312 nm) (UVB-nb) on the proliferation as expression of general toxicity. The running conditions for the essays to evaluate the toxic effects were established in the first part of this work. Known concentrations of yeast cells suspended in PBS were exposed to 550 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ of UVB-nb for different times and the growth rates compared with not exposed controls. The results demonstrated that the effects on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* produced by irradiation with UVB-nb for times up to thirty minutes when compared with controls was not statistically significant.

Key-words: *Saccharomyces cerevisiae* model; cytotoxicity screening; growth inhibition by UVB; high-throughput method.

*Para o autor a quem deve ser endereçada a correspondência:
amilcar.roberto.ulusofona.pt

*To whom correspondence should be addressed:
amilcar.roberto.ulusofona.pt

Introdução

Um método de alto rendimento destinado à triagem da toxicidade geral exercida por agentes físicos e químicos num modelo de *Saccharomyces cerevisiae* foi desenvolvido na parte I deste trabalho^[1]. As condições gerais para a técnica foram estabelecidas e o método validado no que respeita à relação entre a absorvância a 525 nm e o número de células/mL suspensas em meio de cultura YPD (meio YPD extracto de levedura 1%, peptona 0,5% e glucose 2%). As condições padronizadas dos ensaios permitem o uso de valores simples tais como a concentração de um biomarcador ou a inibição da proliferação para quantificar a toxicidade geral na célula bem como o estudar mecanismos biológicos básicos, por isso métodos de triagem de alto rendimento têm sido usados para avaliar o efeitos de tóxicos e medicamentos em alvos biológicos^[2,3,4,5,6].

O *Saccharomyces cerevisiae* é um eucariota unicelular, organismo não patogénico que partilha significativas homologies genéticas e proteicas com mamíferos e tem sido usado como modelo uma variedade alargada de finalidades, desde a toxicidade geral aos estudos mecanísticos^[7,8]. É, por isso, de grande utilidade em estudos de mecanismos biológicos comuns a fungos, plantas, animais e humanos. Além do mais, porque a levedura cresce rapidamente em culturas em meio líquido, os ensaios são, simples, rápidos, rentáveis e podem miniaturados.

UVB-nb tem sido usada como uma alternativa ao PUVA e radiação ultravioleta A (320-400 nm) UVA para activar derivados psoralénicos no tratamento da psoríase existindo vários estudos demonstrando a sua utilidade bem como para outros fins terapêuticos^[9, 10, 11, 12].

Considerando a capacidade da radiação ultravioleta para induzir variações na velocidade de crescimento celular por interferência com o estado fisiológico da célula, o método desenvolvido pode ser aplicado para estudar os efeitos tóxicos da radiação UVB-nb, isolada ou combinada com compostos foto-activos, no modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Além do mais compostos químicos podem ser triados no que diz respeito às suas possíveis capacidades protectoras contra a radiação bem como graduá-las.

Materiais e Métodos

Cultura Celular em Meio Líquido

As culturas celulares usadas nos ensaios foram obtidas de *Saccharomyces cerevisiae* a crescer em placas de Petri contendo meio YPD completo (meio YPD extracto de levedura 1%, peptona 0,5% e glucose 2%) adicionado de 1,5% de agar, por inoculação em 20 mL de YPD contidos num Erlenmeyer de 50 mL. Depois de

Introduction

A high-throughput screening method of general toxicity exerted by chemicals on a *Saccharomyces cerevisiae* model was developed in the part I of this work^[1]. The general running conditions for the technique were then established and the method validated for the relationship between the absorbance at 525 nm and the number of cells/mL suspended in YPD culture medium (YPD - yeast extract 1%, peptone 0.5% and glucose 2%).

Standardized assay conditions enable the use of single values such as the concentration of a biomarker or the inhibition of proliferation to quantify general toxicity on the cell, as well to study basic biological mechanisms; therefore, high-throughput screening methods have been used to evaluate the effects of toxicants and drugs on biological targets^[2,3,4,5,6].

Saccharomyces cerevisiae is a unicellular eukaryotic, non-pathogenic organism that shares significant genetic and proteic homologies with mammals and has been used as model for a wide range of purposes, from the general toxicity to mechanistic studies^[7,8]. It is, therefore, highly useful in the study of basic biological mechanisms common to fungi, plants, animals, and humans. Furthermore, because yeast grows rapidly in liquid cultures, the assays are simple, rapid, cost-effective and can be miniaturized.

UVB-nb has been used as an alternative to PUVA and ultraviolet radiation (320-400 nm) (UVA) for photo-activation of psoralenic derivatives to treat psoriasis and several studies made to demonstrate its usefulness for this propose as well for other therapeutic aims^[9, 10, 11, 12].

Considering the ability of ultraviolet radiation to induce variations on the cells growth rate by interference with the cellular physiological status, the method developed may be applied to study the toxic effects of UVB-nb radiation, alone or combined with photoactive compounds, on the *Saccharomyces* model. Furthermore, chemicals can be scanned by this method in order to identify and graduate their protective effects against ultraviolet radiation.

Materials and Methods

Liquid Cell Culture

The cell cultures to be used in the experiments were obtained from *Saccharomyces cerevisiae* growing in Petri dishes on complete medium YPD (yeast extract 1%, peptone 0.5% and glucose 2%) containing 1.5% agar, by inoculation into 20 mL of YPD in a 50 mL Erlenmeyer. After dispersion, the cultures were placed in the LEEC incubator to grown at 30°C without agitation for sixteen to twenty hours.

dispersão, as culturas foram colocadas na incubadora LEEC para crescerem a 30°C sem agitação por dezasseis a vinte horas.

Método

Cinco amostras de cerca de dez milhões de células retiradas de culturas de *Saccharomyces cerevisiae*, recentemente preparadas, foram transferidas para placas de Petri de 3,2 cm de diâmetro contendo 2 mL de PBS estéril. Quatro das suspensões obtidas foram irradiadas com 550W/cm² de UV-nb por tempos de 5, 10, 15 e 30 minutos respectivamente e a quinta amostra usada como controlo foi mantida ao abrigo de toda a radiação luminosa durante o tempo de irradiação. Após a irradiação, quatro culturas celulares por tempo de irradiação e um controlo foram preparadas por transferência de aproximadamente meio milhão de células para cuvettes descartáveis de 4 mL contendo YPD perfazendo 2,2 mL de volume total. Então, as células foram incubadas a 30°C com 230 ciclos de agitação pelo tempo necessário a ter pelo menos duas horas de fase log. A absorvância de cada cultura celular foi medida a intervalos regulares de trinta minutos durante o tempo de incubação. A correlação entre as absorvâncias e o número de células em suspensão em YPD, previamente estabelecida^[1], foi usada para calcular os dados necessários à construção das curvas de crescimento.

Reagentes

Os reagentes usados nos ensaios foram comprados em fornecedores regulares.

Equipamento

Incubadoras (LEEC Automatic CO₂ Incubator Model GA3010) e (Heidolph Inkubator 1000), agitador (Heidolph Unimax 1010), misturador vortex (VELP Scientifica ZX3), espectrofotómetro (Biochrom Libra S22), lâmpadas Philips TL 01RS para produção da radiação UVB-nb.

Análise Estatística e Matemática

A reprodutibilidade do método foi testada por análise da covariância aplicada aos declives das curvas de crescimento a comparar usando um nível de significância de 0,05. As diferenças entre as velocidades de crescimento entre os grupos de controlo e os irradiados no que respeitava à sua significância estatística foram testadas pelo Teste-t.

Resultados

A concentração celular como função da absorvância a 525 nm é descrita pela equação $X = (\text{abs} - 0.0327) / 6.8219\text{E-}08$ obtida por regressão linear que foi calculada na parte I deste trabalho.

Method

Five batches of about ten millions cells from cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, freshly prepared, were transferred into Petri dishes 3.2 cm diameter containing 2 mL of sterile PBS. Four of the suspensions obtained were irradiated with 550W/cm² of UV-nb for times of 5, 10, 15 and 30 minutes respectively and the fifth used as control group, was maintained protected from any light radiation during the irradiation time. After irradiation, four cell cultures per irradiation time and control were prepared by transferring approximately half million cells into 4mL disposable cuvettes containing YPD medium performing a total volume of 2.2mL. Then, the cells were incubated at 30° C with 230 cycles agitation up to the time necessary to have a minimum of two hours of log phase. The absorbance of each cell culture was measured at regular intervals of thirty minutes during incubation time. The correlation between the cultures absorbance at 525 nm and the number of cells in suspension in YPD, previously established [1], was used to calculate the data necessary for the growth rates curves construction.

Reagents

The reagents used to perform the experiments were purchased from regular suppliers.

Equipment

Incubators (LEEC Automatic CO₂ Incubator Model GA3010) and (Heidolph Inkubator 1000), shaker (Heidolph Unimax 1010), vortex mixer (VELP Scientifica ZX3), spectrophotometer (Biochrom Libra S22), Philips lamps TL 01RS for production the UVB-nb radiation.

Math and Statistical Analysis

The reproducibility of the method was tested by covariance analysis applied to the slopes of the growth curves to be compared using a significance level of 0.05. The differences between the growth rates of control groups and the irradiated groups regarding their statistical significance were tested by T-test.

Results

The cell concentration as a function of the absorbance at 525 nm is described by the equation $X = (\text{abs} - 0.0327) / 6.8219\text{E-}08$ obtained by linear regression that was calculated in the part I of this work.

Phototoxicity

Absorbances at 525 nm of the suspensions of *Saccharomyces* growing in YPD medium were measured at regular intervals of thirty minutes as described before and the number of cells/mL in each cuvette calculated using the equation above.

Fototoxicidade

As absorvâncias a 525 nm das suspensões de *Saccharomyces* crescendo em meio YPD foram medidas a intervalos regulares de trinta minutos como descrito anteriormente e o número de células/mL em cada cuvette calculado usando a equação acima.

As velocidades de crescimento expressas pelos declives da fase log das respectivas curvas de crescimento.

As diferenças entre as médias dos declives dos grupos de controlo, culturas não irradiadas, e as culturas expostas por 5, 10, 15 e 30 minutos a 550W/cm² de UV-nb foram testadas para a significância estatística.

Quatro séries de ensaios, realizados em dias diferentes, mostraram valores das velocidades de crescimento cujas diferenças não tinham significância estatística ($P > 0,05$).

A tabela 1 sumariza os resultados obtidos no que respeita às velocidades de crescimento, suas médias, respectivo desvio padrão e conclusão de que a hipótese nula para as diferenças entre o grupo de controlo e os grupos expostos não é rejeitada.

The cellular growth rates were expressed as the slopes of the log phase of their growth curves. The differences between the means of the slopes of control groups, cultures not irradiated, and the cultures exposed for 5, 10, 15 and 30 minutes to 550W/cm² of UV-nb were tested for statistical significance. The four series of experiments, performed at different days, showed means values of cellular growth rates which differences were not statistically significant ($P > .05$).

The table 1 summarize the results obtained regarding the growth rates, their means, respective standard deviation and the conclusion that the null hypothesis not rejected by T-test for the differences between the control group and the exposed groups.

Tabela 1
Table 1

Exposition Time (min) Tempo de Exposição (min)	Slope of <i>log phase</i> growth curves Declive das curvas de crescimento na <i>fase log</i>				Mean Slope Declive Médio	Standard Deviation Desvio Padrão
	Day 1 Dia 1	Day 2 Dia 2	Day 3 Dia 3	Day 4 Dia 4		
0 (Control)	0.0082	0.0122	0.0081	0.0083	0.0092	0.0020
5	0.0084	0.0102	0.0177	0.0161	0.0131	0.0045
10	0.0084	0.0116	0.0140	0.0130	0.0118	0.0024
15	0.0098	0.0090	0.0133	0.0127	0.0112	0.0021
30	0.0068	0.0080	0.0147	0.0131	0.0107	0.0038

The four days slopes of *log phase* growth curves were compared by the T-Test as follows: 0 min vs. 5 min; 0 min vs. 10 min; 0 min vs. 15 min and 0 min vs. 30 min. All T-Test values obtained were > 0.05 , indicating that there were not statistically significant differences in the growth rate at *log phase* between the four exposition times and the control.

Os declives das curvas de crescimento na *fase log* nos quatro dias foram comparadas pelo Teste-T do modo seguinte: controlo vs 5 min; controlo vs 10 min; controlo vs 15 min; controlo vs 30 min. Todos os valores eram $> 0,05$, indicando que não haviam diferenças estatisticamente significativas nas velocidades de crescimento na *fase log* entre os quatro tempos de exposição e o controlo.

A Figura 1 representa as curvas de crescimento na fase log, entre 2,5 e 4,5 horas de incubação, correspondendo a médias dos quatro ensaios feitos e foram obtidas com base nos logaritmos naturais das concentrações celulares ao longo do tempo de crescimento.

Figure 1 represents growth curves during the log phase, between 2.5 and 4.5 hours of incubation, corresponding to the means of the four assays made and were obtained by plotting the natural logarithm LN of cell concentrations against the incubation time.

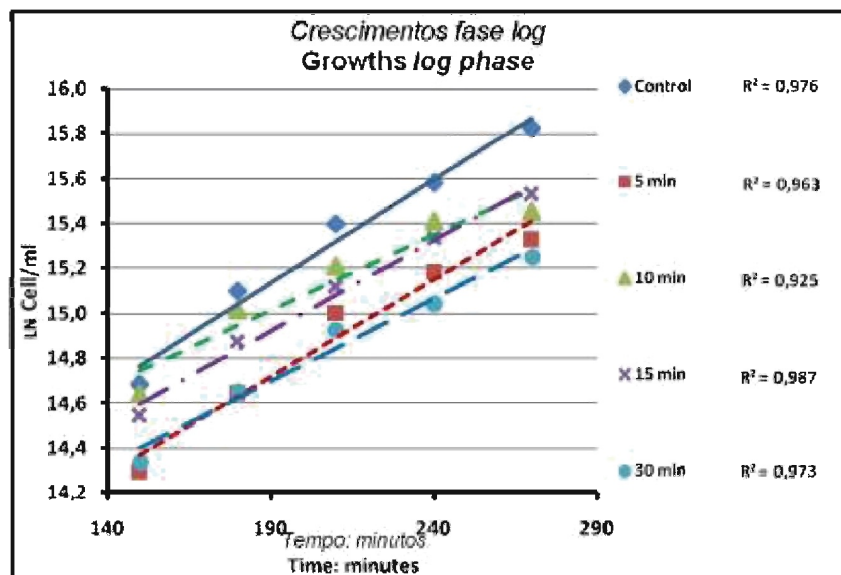


Figura 1 - representa as medias dos crescimentos na fase log de cada grupo, entre 2,5 e 4,5 horas de incubação, durante os quatro ensaios feitos.

Figure 1 - represents the means of the growths in the log phase of each group, between 2.5 and 4.5 hours of incubation, during the four essays performed.

Discussão

Métodos de alto rendimento e outras técnicas têm usado a correlação entre a absorvância e o número de células em suspensão crescendo em meio de cultura líquido, incluindo o *Saccharomyces cerevisiae*, como um processo simples, rápido e validado para contagem de células^[4,7,13].

A reprodutibilidade e aplicabilidade deste método de contagem são dependentes da factores tais como a concentração celular da suspensão e a sua homogeneidade. A correlação entre a absorvância e o número de células em suspensão é válida desde que a absorvância não exceda valores próximos de 0,900 correspondentes a concentrações celulares da ordem de $1,3 \times 10^7$ células/mL que são conseguidas com inoculações de cerca de meio milhão de células.[1] Além disto, as condições experimentais estabelecidas para a realização dos ensaios garantem que a fase log do crescimento do *Saccharomyces* está já em pleno desenvolvimento depois de duas horas de incubação a 30°C e agitação de 230 ciclos por minuto.

Então, é possível recolher dados depois de duas horas de proliferação do *Saccharomyces cerevisiae* em meio de cultura líquido, adequados ao rastreio da toxicidade geral exercida por xenobióticos, nomeadamente radiação UVB-nb.

Discussion

High-throughput methods and other techniques have used the correlation between the absorbance and the number of cells in suspension growing in liquid culture medium, including *Saccharomyces cerevisiae*, as a simple, fast and validated tool for counting cells^[4,7,13].

The reproducibility and the applicability of this counting method are dependent of factors such as the cellular concentration of the suspension and its homogeneity. The correlation between the absorbance and the number of cells in suspension is valid until the absorbance does not exceed values near 0.900 corresponding to cell concentrations of approximately 1.3×10^7 cells/mL which is achieved starting the cultures with inoculations of about half million cells^[1]. Furthermore, the experimental conditions established to perform the essays guarantee that the growth log phase of *Saccharomyces* is readily on after tow hours of incubation at 30° and agitation speed of 230 cycles/min. Hence, it is possible to collect data after tow hours of *Saccharomyces cerevisiae* proliferating in liquid medium, suitable to scan the general cytotoxicity exerted by xenobiotics, namely UVB-nb radiation. The results can then be used for ranking the responses according the experimental conditions and further studies on, among others, photo-activation of

Os resultados podem então ser usados para o escalonamento de respostas de acordo com as condições experimentais e mais estudos sobre, entre outros, foto-activação d compostos destinados a terapias ou a protecção contra radiação ultravioleta, mecanismos envolvidos em efeitos biológicos de tais agentes bem como interacções entre os que podem actuar como indutores, amplificadores ou repressores da toxicidade.

Estudos sobre efeitos danosos da radiação no *Saccharomyces* são normalmente efectuados usando irradiações altamente energéticas com raios X, raios Y, incluindo radiação UV 254-280 nm produzida por lâmpadas germicidas, associadas a tempos curtos de exposição onde cerca de 15 segundos são suficientes para produzir inibições de crescimento da ordem dos 50%^[14, 15, 16].

A irradiação com UVB-nb foi escolhida para este estudo atendendo ao que actualmente este tipo de radiação UVB é usada para fins terapêuticos em pacientes sofrendo de psoríase, vitiligo, dermatite atópica entre outras doenças de pele, associada com as vantagens postuladas de maior eficácia e menos efeitos adversos comparados com os exercidos pela PUVA convencional. Contudo, foi relatado que tratamentos usando uma combinação de UVB-nb com psoraleno apresentou respostas com reacções adversas de fototoxicidade mais elevadas em comparação com as apresentadas por pacientes tratados apenas com UVB-nb^[17, 18, 19, 20].

A falta de significância estatística das diferenças das respostas de toxicidade geral, entre os grupos de controlo e as culturas de *Saccharomyces* expostas a UVB-nb até trinta minutos, observada nos ensaios está, como seria de esperar, de acordo com os menores efeitos adversos reportados para as terapias com esta radiação.

Os resultados obtidos, no que se refere à fototoxicidade da UVB-nb indicam que, futuros estudos sobre toxicidade fotoquímica exercida no *Saccharomyces cerevisiae* quando feitos com este tipo de radiação como agente de activação representarão principalmente os efeitos do composto químico activado com contribuição menor da radiação.

Agradecimento

Os autores agradecem ao Eng. Luís M. M. Colaço a assistência técnica e aconselhamento indispensável para a construção do equipamento usado para as irradiações.

compounds intended for therapeutic proposes or as protectors against UV radiation, mechanisms involved on the biologic effects of such agents as well interactions between those that can act as inducers, enhancers or repressors of the toxicity.

Studies dealing with deleterious effects of radiation on *Saccharomyces* are usually performed using high energetic irradiations with X-, Y-rays including UV radiation 254-280 nm produced by germicidal lamps, associated with short times exposition where ca fifteen seconds are enough to produce growth inhibitions ranging 50%^[14, 15, 16].

The irradiation with UVB-nb was elected for this study attending the actual use of this kind of UVB for therapeutic proposes in patients suffering psoriasis, vitiligo, atopic dermatitis and other skin diseases, associated with the advantages postulated of higher efficacy and less adverse effects compared to those exerted by the conventional PUVA. Although, it has been reported that treatments using a combination of UVB-nb with psorelen showed responses with higher phototoxic adverse reactions when compared with those presented by patients treated only with UVB-nb^[17, 18, 19, 20].

The missing statistically significant differences of general toxicity responses, between control groups and the cultures exposed to UVB-nb up to thirty minutes observed in the experiments is, as could be expected, in accordance with the less adverse effects reported of therapies with this radiation.

The results obtained, regarding the phototoxicity of UVB-nb indicate that, becoming studies dealing with photochemical toxicity exerted on *Saccharomyces cerevisiae* when performed with this radiation type as activation agent will almost represent the effects of the chemical activated with a minor photo-contribution of the radiation.

Acknowledgment

The authors gratefully offer special thanks to Eng. Luis M M Colaço for the advice, technical expertise and support to the construction of the equipment used to perform the irradiations.

Referências / References

- [1].Roberto A and Caetano PP. A High-throughput screening method for general cytotoxicity part I Chemical toxicity. *Rev Cs e Tecn de Saúde* 2005 (2)2:95-100.
- [2].Walum E, Hedander J, Garberg P. Research perspectives for pre-screening alternatives to animal experimentation on the relevance of cytotoxicity measurements, barrier passage determinations and high throughput screening in vitro to select potentially hazardous compounds in large sets of chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Sep 1;207(2 Suppl):393-7.
- [3].Mary Ellen Digan, Chantevy Pou, Honglin Niu, Ji-Hu Zhang. Evaluation of Division-Arrested Cells for Cell-Based High-Throughput Screening and Profiling. *J Biomol Screen* 2005 10: 615-623.
- [4]. Yarrow JC, Feng Y, Perlman ZE, Kirchhausen T, Mitchi, Fahlen T et al 2005son TJ. Phenotypic screening of small molecule libraries by high throughput cell imaging. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2003 Jun;6(4):279-86.
- [5]. Alt V, Bechert T, Steinrucke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, Domann E, Schnettler R.. In vitro testing of antimicrobial activity of bone cement. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Nov;48(11):4084-8.
- [6]. European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)). <http://ecvam.jrc.it/index.htm> - 06/10/2005 17:00
- [7].CostaV, Amorim MA, Reis E, Quintanilha A, Moradas-Ferreira P. Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology*. 1997 May;143 (Pt 5):1649-56.
- [8]. Yang M, Jensen LT, Gardner AJ, Culotta VC. Manganese toxicity and *Saccharomyces cerevisiae* Mam3p, a member of the ACDP (ancient conserved domain protein) family. *Biochem J*. 2005 Mar 15; 386(Pt 3):479-87.
- [9]. Green C, Ferguson J, Lakshmipathi T, Johnson BE. 311nm UVB phototherapy-an effective treatment for psoriasis. *Br J Dermatol*. 1988 Dec; 119(6):691-6.
- [10]. Storbeck K, Holzle E, Schurer N, Lehmann P, Plewig G. Narrow-band UVB (311 nm) versus conventional broad-band UVB with and without dithranol in phototherapy for psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 1993 Feb; 28(2 Pt 1):227-31.
- [11]. Bandow GD, Koo JY. Narrow-band ultraviolet B radiation: a review of the current literature. *Int J Dermatol*. 2004 Aug; 43(8):555-61.
- [12]. Martin-Ezquerria G, Sanchez-Regana M, Umbert-Millet P. Optimization of narrow-band uvb with a 5% oleic acid cream in the treatment of psoriasis. *J Drugs Dermatol*. 2007 Mar; 6(3):290-2.
- [13].Fahlen T, Sunga J, Rask J, Herrera A, Lam K, Sing L, Sato K, Ramos RA, Kirven-Brooks M, Reiss-Bubenheim D.Methods for the culture of *C. Elegans* and *S. Cerevisiae* in microgravity. *Gravit Space Biol Bull*. 2005 Jun;18(2):91-2.
- [14]. Meier A, Thoma F. RNA polymerase I transcription factors in active yeast rRNA gene promoters enhance UV damage formation and inhibit repair. *Mol Cell Biol*. 2005 Mar; 25(5):1586-95.
- [15]. Hashimoto S, Ogura M, Aritomi K, Hoshida H, Nishizawa Y, Akada R. Isolation of auxotrophic mutants of diploid industrial yeast strains after UV mutagenesis. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Jan; 71(1):312-9.
- [16]. Zhang H, Gibbs PE, Lawrence CW. The *Saccharomyces cerevisiae* rev6-1 mutation, which inhibits both the lesion bypass and the recombination mode of DNA damage tolerance, is an allele of POL30, encoding proliferating cell nuclear antigen. *Genetics*. 2006 Aug; 173(4):1983-9.
- [17]. Yones SS, Palmer RA, Garibaldinos TM, Hawk JL. Randomized Double-blind Trial of Treatment of Vitiligo: Efficacy of Psoralen-UV-A Therapy vs Narrowband-UV-B Therapy. *Arch Dermatol*. 2007 May; 143(5):578-584.
- [18]. Vuillamie M, Parienti JJ, Domp Martin A, Leroy D. Incidence of drug-induced photosensitization during phototherapy. *Ann Dermatol Venereol*. 2006 Apr; 133(4):333-9.
- [19]. El-Mofty M, El-Darouty M, Salonas M, Bosseila M, Sobeih S, Leheta T, Nada H, Tawdy A, Amin I, El-Enany G. Narrow band UVB (311 nm), psoralen UVB (311 nm) and PUVA therapy in the treatment of early-stage mycosis fungoides: a right-left comparative study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2005 Dec; 21(6):281-6.
- [20].Westerhof W, Nieuweboer-Krobotova L. Treatment of vitiligo with UV-B radiation vs topical psoralen plus UV-A. *Arch Dermatol*. 1997 Dec; 133(12):1525-8.