

Investigação genotóxica do extrato aquoso de *Rhizophora magle* L. em ratas *Wistar*

Genotoxic investigation of aqueous extract of *Rhizophora magle* L. in *Wistar* rats

Ian D Duarte¹, Maressa Malini², Jones B Graceli³ e Silvia T Matsumoto^{4*}

1. Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, UFES – Campus de Goiabeiras, CEP 29075-910 - Vitória, ES, Brasil, 2. Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, UEL – Campus universitário, CEP: 86051-980 – Londrina, PR, Brasil, 3. Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, UFES – Campus de Maruípe, CEP 29.040-090- Vitória, ES, Brasil, 4. Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, UFES – Campus de Goiabeiras, CEP 29075-910 - Vitória, ES, Brasil.
*Autor para contato: siltamie@gmail.com

Resumo A fabricação da panela de barro pela Associação das paneleiras de Goiabeiras (Vitória, Espírito Santo, Brasil) é patrimônio cultural capixaba. Pesquisas apontam que o extrato aquoso da casca de *Rhizophora mangle* L., utilizado na etapa de açoite, apresenta alta concentração de polifenóis, majoritariamente taninos poliméricos e hidrolisáveis. A avaliação da atividade genotóxica pelo ensaio do cometa é necessária, pois oferece informações importantes acerca da atividade biológica do extrato. Neste aspecto, os roedores são utilizados por possuírem características genéticas similares às dos humanos. Assim, o trabalho avaliou a genotoxicidade do extrato aquoso por meio de eritrócitos de ratas *Wistar* pelo ensaio do cometa. Foram definidas as dosagens 70, 140 e 280 mg/kg p.c. do extrato de *R. mangle*, e utilizaram-se ratas sobe tratamento de 15 dias com o extrato aquoso via gavagem. Após o tratamento, coletou-se o sangue para realização do ensaio. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA seguida pelo teste de Dunnett ($p < 0.05$). Os resultados obtidos com o ensaio do cometa não demonstraram efeito genotóxico. Sugerindo, preliminarmente, que o extrato avaliado não oferece dano ao material genético.

Palavras-chaves: ensaio do cometa, genotoxicidade, mangue-vermelho.

Abstract The fabrication of the clay pot by the Association of pan makers from Goiabeiras (Vitória, Espírito Santo, Brazil) is a cultural heritage of the *capixaba* people. Research indicates that the aqueous extract from the bark of *Rhizophora mangle* L., used in step whipping, has a high concentration of polyphenols, mainly polymer and hydrolysable tannins. The assessment of genotoxic activity by the comet assay is necessary because it provides important information about the biological activity of the extract. In this aspect, rodents are used because they having similar genetic characteristics to humans.

Thus, the study evaluated the genotoxicity of the aqueous extract using erythrocytes of *Wistar* rats by the comet assay. From the *R. mangle*'s extract were defined the doses: 70, 140 and 280mg/kg b.w. The treatment with the aqueous extract was made by gavage in female rats up to 15 days. After the treatment, blood was collected for the performance of the test. For the statistical analysis, was used ANOVA followed by Dunnett's test ($p < 0.05$). The results obtained with the comet assay showed no genotoxic effects. Suggesting, preliminarily, that the assessed extract does not damage the genetic material.

Keywords: comet assay, genotoxicity, red mangrove.

Introdução

As mutações são alterações espontâneas e herdáveis do material genético (Burns e Bottino 1991) e estão relacionadas à perturbação do desenvolvimento e da fisiologia, extremamente complexos e finamente sintonizados dos organismos (Alberts *et al.* 2002). O conhecimento dos componentes físicos, químicos e biológicos que causam alterações gênicas e genômicas é necessário para melhor preservar a saúde humana ao longo do tempo. Segundo Ribeiro *et al.* (2003), a crescente utilização de produtos como fármacos, corantes e outros, tem resultado no aumento da mutagênese ambiental.

Rhizophora mangle L., família Rhizophoraceae, é nativa dos manguezais e conhecida como “mangue-vermelho”. Sobretudo na região caribenha, apresenta vários usos etnofarmacológicos, como antisséptico, adstringente e hemostático (Roig 1974). Na cultura Capixaba, no estado do Espírito Santo, Brasil, o extrato da casca de *R. mangle* é utilizado no processo de fabricação das

tradicionais panelas de barro pela Associação das Panelas de Goiabeiras. O extrato é utilizado na etapa de açoitamento, para curtir e impermeabilizar a panela, além de servir para aumentar o tempo de aquecimento dos alimentos (Kaniski 2001).

Dentre os ensaios realizados com os roedores, destaca-se o método da eletroforese de célula única. Também denominado ensaio do Cometa, o método descrito por Singh *et al.* (1988) e modificado por Speit e Hartmann (1999) pode revelar eventos genotóxicos. Quando estes ocorrem, há a fragmentação no material genético, possibilitando a migração de pequenos fragmentos do DNA por meio do gel de agarose durante a eletroforese. Devido a sua sensibilidade e possibilidade ampla aplicação (Collins 2004), o ensaio do cometa é importante método utilizado no estudo de fármacos (Kalantari *et al.* 2013) e extratos naturais (Moretti *et al.* 2013).

Tendo em vista a utilização do extrato aquoso da casca da *R. mangle* na medicina popular e na confecção de panelas de barro utilizadas como utensílios no cozimento de alimentos, faz-se necessário a investigação de potenciais efeitos tóxicos sobre o DNA. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar genotoxicidade do extrato aquoso de *R. mangle* em ratas da linhagem *Wistar* por meio do ensaio do cometa.

Métodos

Coleta da casca de *R. mangle* e obtenção do extrato

A casca da *R. mangle* foi coletada pela Associação das Panelas de Goiabeiras em maio de 2010 no manguezal que margeia a localidade de Goiabeiras, situada no Município de Vitória (ES/Brasil) - 20°15'56.45"S / 40°18'1.27"O. Um exemplar autêntico está depositado no herbário da Universidade Federal do Espírito Santo sob o registro número 673. Para o preparo do extrato aquoso foi seguido o procedimento realizado por Malini *et al.* (2010). Para o ensaio biológico foram avaliadas três doses do extrato de *R. mangle* (70, 140 e 280mg/kg p.c.), escolhidas após a determinação da DL50 pelo estudo de Malini (2011).

Bioensaios com ratas adultas da linhagem *Wistar*

Para os ensaios *in vivo* foram utilizadas ratas adultas *Wistar* com 12 semanas de vida, pesando \pm 250g e apresentando ciclo reprodutivo regular, fornecidas pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Todos os animais foram aclimatados por sete dias a temperatura controlada (23°C), em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno com tampa grade, de acordo com as recomendações do "Canadian Council Animal Care" (Olfert *et al.* 1993).

A avaliação genotóxica foi realizada em cinco grupos experimentais de quatro ratas da linhagem *Wistar*, totalizando 20 animais. Os extratos foram administrados via gavagem diária, com o volume de 0,3 mL por animal. Os animais foram pesados

diariamente e aos mesmos foram disponibilizados água e alimento *ad libitum* durante todo o experimento. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Espírito Santo, por meio do parecer 008/2008.

Durante 15 dias de tratamento, os grupos denominados EXT1, EXT2 e EXT3, correspondentes respectivamente às dosagens 70, 140 e 280 mg/kg p.c., foram tratados com o extrato conforme supracitado. Ao quarto grupo, Controle Negativo, foi administrado água. E ao quinto grupo, Controle Positivo, foi administrado água, e realizado 24 horas antes das análises, injeção intraperitoneal de solução de ciclofosfamida 1,5 mg/mL para cada 100 g de peso corporal dos animais. Após 15 dias de tratamento, caracterizando tratamento sub-agudo, amostras de sangue foram coletadas da região apical da cauda de cada animal ainda vivo.

Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Singh *et al.* (1988) com modificações. Das amostras coletadas, uma alíquota de 5 μ L de sangue heparinizado foi misturada em 100 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,75%), a 37°C, e aplicadas numa lâmina de microscópio previamente revestida com agarose (1,5%) em PBS. Posteriormente, cada lâmina foi coberta com uma lamínula e acondicionadas durante 20 minutos a 4°C para a sua solidificação.

Ao término deste período, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em uma solução gelada de lise alcalina (2,5 M NaCl, 10 mM tris, 100 mM EDTA, 10% dimetil sulfoxido e 1% triton X-100, pH 10.0) por no mínimo uma hora, sob proteção contra luz. Após a lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese contendo tampão alcalino (0,3 M de NaOH, 1 mM de EDTA, pH 13), onde permaneceram incubadas por 20 minutos, seguida de eletroforese em 25 V: 300 mA (1,25 V/cm) por 20 minutos.

Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com água destilada, fixadas em etanol 100% por 10 minutos e coradas com brometo de etídio (20 μ g/mL). Para cada espécime foram confeccionadas duas lâminas e analisados aleatoriamente 100 nucleoides em aumento de 1000X utilizando microscópio Nikon E200, de fluorescência combinando luz azul (488 nm) e filtro amarelo.

Para a análise de distribuição dos cometas e quantificação dos mesmos nas classes de danos, foi utilizada a classificação visual dos cometas proposta por Collins *et al.* (1995), levando-se em consideração o comprimento de calda e diâmetro da cabeça do cometa. A partir disso, foram calculados os Índices de dano no DNA (ID_{ua}) a partir da fórmula $ID_{(ua)} = [(N1 + 2N2 + 3N3 + 4N4)/S] \times 100$, onde N1-N4 = classe dos nucleoides (1,2,3,4) e S = número total de nucleoides analisados. Tal método é recomendado por diversos estudos (Collins *et al.* 1997, Tice *et al.* 2000, Collins 2004, Collins *et al.* 2008).

Análise estatística

Para a análise estatística do potencial genotóxico, foram calculadas as médias das frequências de danos em suas classes correspondentes e o $ID_{(ua)}$ dos respectivos grupos, e foi realizada a

comparação com o controle negativo por meio do teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnett ($p < 0.05$), sendo EPM o Erro padrão da média.

Resultados e discussão

As plantas de manguezal, incluindo *R. mangle*, apresentam vasto potencial para a produção de medicamentos, agroquímicos e outros compostos com atividade biológica (Patra e Thatoi 2011). Estudos apontam que o extrato da casca da *R. mangue* apresenta ação antibacteriana (Melchor *et al.* 2001, Pereira *et al.* 2008), antisséptica (Fernandez *et al.* 2002), anti-úlceras (Pereira *et al.* 2001, Berenguer *et al.* 2006, Faria *et al.* 2012), antioxidante (Sánchez *et al.* 2006, Sánchez *et al.* 2010), cicatrizante (Sánchez *et al.* 2009) e a atividade antimutagênica em sistema teste *Allium cepa* e experimento *in vitro* (Malini *et al.* 2010).

No presente trabalho, os resultados do ensaio do cometa não revelaram atividade genotóxica do extrato aquoso da casca da *R. mangle* em nenhuma das concentrações avaliadas do extrato aquoso. Ou seja, todos os grupos nos quais foram administrados o extrato aquoso (EXT1, EXT2 e EXT3) não apresentaram valores significativamente superiores de Índice de dano no DNA (ID_{ua}) quando comparados com o Controle Negativo (Tabela 1).

Quanto à observação da frequência de nucleoides nas classes de danos - Classe 0, Classe 1, Classe 2, Classe 3 e Classe 4 - observa-se que não há diferenças significativas em comparação ao Controle Negativo (Tabela 1). O que demonstra a ausência de potencial genotóxico do extrato aquoso de *R. mangle* nas concentrações 70, 140 e 280 mg/kg p.c. no sistema teste utilizado. Essa constatação é de grande valia, pois o ensaio do cometa se apresenta como teste complementar ao teste do micronúcleo tendo em vista que o primeiro avalia o potencial genotóxico e o segundo, a mutagenicidade (Rothfuss *et al.* 2010).

Como posto por Kamman *et al.* (2001), os eventos que são constatados pelo ensaio do cometa como a fragmentação ou quebra

Tabela 1 Classes de danos e Índice de Danos no DNA (ID_{ua}) pelo ensaio do cometa em ratas da linhagem *Wistar* após tratamento com extrato aquoso de *R. mangle* nas concentrações 70 mg/kg p.c. (EXT1), 140 mg/kg p.c. (EXT2) e 280 mg/kg p.c. (EXT3).

	Espécimes	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	$ID(ua)$
Controle Negativo	I	97	3	0	0	0	3
	II	98	1	1	0	0	3
	III	97	2	1	0	0	4
	IV	97	2	0	1	0	5
	Média ± EPM	97.250 ± 0.250	2.000 ± 0.408	0.500 ± 0.289	0.250 ± 0.250	0	3.750 ± 0.479
Controle Positivo	I	8	27	35	22	8	195
	II	9	32	33	19	7	183
	III	11	29	34	18	8	183
	IV	17	30	33	15	5	161
	Média ± EPM	11.250 ± 2.016*	29.500 ± 1.041*	33.750 ± 0.479*	18.500 ± 1.443*	7.000 ± 0.707*	180.500 ± 7.089*
EXT1	I	98	1	0	1	0	4
	II	97	2	1	0	0	4
	III	96	3	1	0	0	5
	IV	98	2	0	0	0	2
	Média ± EPM	97.250 ± 0.479	2.000 ± 0.408	0.500 ± 0.289	0.250 ± 0.250	0	3.750 ± 0.629
EXT2	I	99	1	0	0	0	1
	II	100	0	0	0	0	0
	III	98	2	0	0	0	2
	IV	98	1	1	0	0	3
	Média ± EPM	98.750 ± 0.479	1.000 ± 0.408	0.250 ± 0.250	0	0	1.500 ± 0.645
EXT3	I	99	1	0	0	0	1
	II	99	1	0	0	0	1
	III	100	0	0	0	0	0
	IV	99	1	0	0	0	1
	Média ± EPM	99.250 ± 0.250	0.750 ± 0.250	0	0	0	0.750 ± 0.250

de fitas de DNA são considerados lesões potencialmente pré-mutagênicas, pois tais quebras estão relacionadas a propriedades mutagênicas e carcinogênicas dos agentes. Com relação ao potencial mutagênico, Pereira *et al.* (2010) não observaram mutagenicidade do extrato aquoso de *R. mangle* ao realizar experimentos em camundongos. Neste caso, a frequência de micronúcleos em células de medula óssea não diferiu significativamente entre os grupos tratados e o controle negativo.

A ausência de genotoxicidade observada neste trabalho, e de mutagenicidade relatada por Pereira *et al.* (2010), podem estar relacionados ao efeito terapêutico atribuído ao extrato aquoso da *R. mangle*, sobretudo devido à presença de taninos que são componentes polifenólicos presentes em plantas e apresentam funções biológicas como controle de insetos, fungos e bactérias (Aerts *et al.* 1999). Como constatado por Sánchez *et al.* (2009), a casca de *R. mangle* contém grandes concentrações de polifenóis (54,78 %), representados majoritariamente por taninos poliméricos (80%) e taninos hidrolisáveis (20%). Esses polifenóis apresentam a capacidade de complexação com íons metálicos, atividade sequestradora de radicais livres e habilidade de complexar com macromoléculas. Essas características presentes em todos os taninos possibilitam a sua grande atividade farmacológica (Haslam 1996, Haslam 1998).

Diante do exposto, os resultados obtidos pelo ensaio do cometa permite concluir que o extrato aquoso da casca da *Rhizophora mangle* L. utilizado na confecção das panelas de barro pela Associação das Paneleiras de Goiabeiras do município de Vitória/ES, nas concentrações de 70mg/Kg p.c., 140mg/Kg p.c. e 280mg/Kg p.c. não apresenta atividade genotóxica em ratas da linhagem *Wistar*. Tendo em vista as observações de Harkness e Wagner (1993) a respeito das semelhanças das características fisiológicas e genéticas entre roedores e humanos, os resultados encontrados neste trabalho apresentam possibilidade de extensão aos humanos. Todavia, salienta-se a necessidade de testes complementares tais como testes em culturas de células humanas.

Agradecimentos

A realização desse trabalho teve o financiamento pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo - FAPES e ao Fundo de Apoio a Ciência e Tecnologia do Município de Vitória - FACITEC.

Referências

Aerts TJ, Barry TN, McNabb WC. (1999) Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. **Agriculture, Ecosystems and Environment** 75:1-12.
Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K. (2002)

Fundamentos da Biologia Celular. 2.ed. Porto Alegre, Editora Artmed.
Berenguer B, Sánchez LM, Quílez A, López-Barreiro M, de Haro O, Gálvez J, Martín MJ. (2006) Protective and antioxidant effects of *Rhizophora mangle* L. against NSAID – induced gastric ulcers. **Journal Ethnopharmacology** 103:194-200.
Burns GW, Bottino PJ. (1991) **Genética**. 6.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.
Collins AR, Ma AG, Duthie SJ. (1995) The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidine) in human cells. **Mutation Research** 336: 69 – 77.
Collins A, Dusinska M, Franklin M. (1997) Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 30:139-146.
Collins A. (2004) Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. **Molecular Biotechnology**.26:249-261.
Collins A, Oscoz A, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith C, Stetina R. (2008) The Comet assay: topical issues. **Mutagenesis** 30:143-151.
Faria FM, Almeida ACA, Luiz-Ferreira A, Dunder RJ, Takayama C, Silva MS, Silva MA, Vilegas W, Rozza AL, Pellizzon CH, Toma W, Souza-Brito ARM. (2012) Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L. **Journal of Ethnopharmacology** 139: 234-243.
Fernandez O, Capdevila JZ, Dalla G, Melchor G. (2002) Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of pen surgical wounds. **Fitoterapia** 73: 564-568.
Harkness JE, Wagner JE. (1993) **Biologia e Clínica de Coelho e Roedores**, 3.ed. São Paulo: Roca.
Haslam E. (1996) Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products** 59: 205-215.
Haslam E. (1998) **Practical Polyphenols – from structure to molecular recognition and physiological action**. Cambridge, Cambridge University Press.
Kalantari H, Rezaei M, Salehcheh M, Moosavi M, Varnaseri G. (2013) Determination of the Mutagenicity Potential of Dillsun Herbal Medicine by Single Cell Gel Electrophoresis in Rat Hepatocytes. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products** 8: 55-59.
Kamman U, Bunke M, Steinhart H. (2001) A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research** 498: 61-77.
Kaniski AL. (2001) **Uma Proposta Etnomatemática: o caso das paneleiras capixabas**. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Educação – Centro de Educação. Vitória, Universidade Federal do Espírito Santo.
Malini M, Marin-Morales M, Mantovani M, Jamal C, Nati N, Passos T, Matsumoto S. (2010) Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test. **Genetics and Molecular Biology** 33: 176-181.
Malini M. (2011) **Avaliação toxicogenética do extrato aquoso de *Rhizophora mangle* utilizando células de mamíferos em ensaios *in vitro* e *in vivo***. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular – Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular. Londrina, Universidade Estadual de Londrina.
Melchor G, Armenteros M, Fernández O, Linares E, Fragas I. (2001) Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* bark. **Fitoterapia** 72: 689-691.
Moretti M, Cossignani L, Messina F, Dominici L, Villarini M, Curini M, Marcotullio MC. (2013) Antigenotoxic effect, composition and antioxidant activity of *Dendrobium speciosum*. **Food Chemistry** 140: 660-665.
Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA (1993) **Guide to the Care and Use of**

- Experimental Animals.** 2 ed. Ottawa, Canadian Council on Animal Care.
- Patra JK, Thatoi HN. (2011) Metabolic diversity and bioactivity screening of mangroves plantas: a review. **Acta Physiologiae Plantarum** 33:1051-1061.
- Perera LMS, Ruedas D, Gómez BC. (2001) Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle* L. **Journal Ethnopharmacology** 77:1-3.
- Perera LMS, Varcacel L, Escobar A, Noa M. (2008) Polyphenol and Phytosterol Composition in Antibacterial Extract from *Rhizophora mangle* (L.) Bark. **Journal of Herbal Pharmacotherapy** 7: 107-128.
- Perera LMS, Escobar A, Souccar C, Remigio MA, Mancebo B. (2010) Pharmacological and toxicological evaluation of *Rhizophora mangle* L., as a potential antiulcerogenic drug: Chemical composition of active extract. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy** 2: 56-63.
- Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. (2003) **Mutagênese Ambiental.** Canoas, Editora da ULBRA.
- Roig JT (1974) **Plantas Medicinales, Aromáticas y Venenosas de Cuba.** La Habana, Editorial Revolución y progreso.
- Rothfuss A, O'donovan M, De Boeck M, Brault D, Czich A, Custer L, Hamada S, Plappert-Helbig U, Hayashi M, Howe J, Kraynak AR, Van Der Leede BJ, Nakajima M, Priestley C, Thybaud V, Saigo K, Sawant S, Shi., Storer R, Struwe M, Vock E, Galloway S (2010) Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies. **Mutation Research** 702: 40-69.
- Sánchez J, Melchor G, Martínez G, Escobar A, Faure R. (2006) Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark. **Fitoterapia** 77: 141-143.
- Sánchez J, Faure R, Martínez G, Veja E, Fernández O. (2009) Propiedades antioxidantes de *Rhizophora mangle* (L.) y su relación con el proceso de curación de heridas en ratas. **Revista de Salud Animal** 31: 170-175.
- Sánchez JC, García RF, Cors MTM. (2010) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical and superoxide anion scavenging activity of *Rhizophora mangle* (L.) Bark. **Pharmacognosy Research** 2: 279-284.
- Singh NP, Mccoy MT, Tice RR, Schneider EL. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research** 175:184-191.
- Speit G, Hartmann A. (1999) The comet assay (single-cell gel test). **Methods Molecular Biology** 113: 203-212.
- Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 35:206-221.