

Avaliação da eficácia do método de micronúcleos *in vitro* utilizando kit comercial e comparação com o método de microscopia



<https://doi.org/10.56238/sevened2023.004-059>

Karine Renata Dias Silveira

Bioinnova Soluções em Biotecnologia, Brasília, DF.
Programa de Pós Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, UCB, Brasília, DF.

Hilana dos Santos Brunel

Bioinnova Soluções em Biotecnologia, Brasília, DF.

Rosângela Vieira de Andrade

Programa de Pós Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, UCB, Brasília, DF.

RESUMO

O teste de micronúcleos *in vitro* é uma importante ferramenta na investigação do potencial genotóxico

de produtos. A realização do teste pelo método de microscopia óptica requer treinamento e atenção do técnico que faz a leitura das lâminas e pode ser um processo extremamente lento. A técnica de análise de micronúcleos por citometria de fluxo surge como um ensaio de alta complexidade que possibilita aumentar a quantidade de análises e reduzir o tempo gasto nos experimentos. Alguns kits comerciais são vendidos para a realização desse teste, entretanto, em alguns casos, podem ser muito onerosos para o laboratório. Esse trabalho demonstrou que a técnica de micronúcleos *in vitro* por microscopia e por citometria são equivalentes e que além disso é possível otimizar a utilização de reagentes comerciais para redução de custos.

Palavras-chave: Micronúcleo, Teste *in vitro*, Citometria.

1 INTRODUÇÃO

A análise de segurança de produtos é fundamental para a avaliação geral de medicamentos, cosméticos, aditivos alimentares, inseticidas e outros agentes de consumo para garantir que não trarão prejuízos à saúde humana ou de quem tem contato com eles. Um importante ensaio rotineiramente realizado e recomendado pela OECD para analisar a segurança de produtos é a investigação do potencial genotóxico dos mesmos (Turkez et al., 2017).

Produtos considerados genotóxicos são aqueles que, quando em contato com uma célula, interagem com material genético, produzindo alterações em sua estrutura ou função. Já quando essas alterações ocorrem e são transmitidas às células-filhas, passam a ser denominadas como mutações. As mutações são hereditárias e essas mudanças no conteúdo estrutural do DNA, seja em uma célula somática ou em uma célula germinativa, podem causar diversas doenças ao indivíduo afetado, incluindo o câncer (Buick et al., 2020; Turkez et al., 2017).

Um dos testes usados na rotina para avaliação de potencial genotóxico é o ensaio de micronúcleos *in vitro* (MNvit), que detecta a presença de micronúcleos (MN) no citoplasma de células interfásicas. Micronúcleos podem se originar de cromossomos acêntricos fragmentados, ou cromossomos inteiros que foram incapazes de migrar para os pólos durante uma das fases de divisão



celular, a anáfase. O MNvit é um método *in vitro* que fornece uma base abrangente para investigar o potencial de dano cromossômico. É capaz de detectar tanto os efeitos clastogênicos (que quebram cromossomos), quanto os aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) em células que sofreram divisão celular durante ou após a exposição ao produto químico em estudo (Buick et al., 2020).

A presença de micronúcleos em células humanas é um indicador de danos no material genético e pode estar relacionada ao desenvolvimento de problemas reprodutivos e de doenças como por exemplo o câncer. Bhatia & Kumar, 2013 demonstraram que a presença de micronúcleos em células de pessoas expostas a agentes mutagênicos está associada a um risco aumentado de desenvolvimento de câncer de pulmão, de cabeça e pescoço e de bexiga. Além disso, Fenech, 2011 relatou que a presença de micronúcleos pode afetar a capacidade reprodutiva e a saúde geral dos indivíduos.

Em células de mamíferos é particularmente relevante para avaliar o potencial de agentes químicos e físicos em afetar a saúde humana. Estudos mostram que esses testes *in vitro* são úteis para identificar agentes genotóxicos e carcinogênicos ou provar a biocompatibilidade de materiais (Bryce et al., 2008; Witt et al., 2008). Um dos trabalhos já realizados analisou a genotoxicidade em extratos de implantes dentários de *Porous NiTi* (pNiTi) produzidos por *Metal Injection Molding* (MIM). Utilizando-se do teste de micronúcleos *in vitro* os pesquisadores demonstraram compatibilidade celular do produto com as linhagens celulares L-929 (fibroblasto) e V79-4 (N W N A et al., 2023). Outro trabalho analisou o extrato de *cohosh* negro (BCE), um suplemento dietético amplamente utilizado para aliviar sintomas de doenças ginecológicas em mulheres, que ainda não teve sua toxicidade bem caracterizada. Os testes mostraram que o BCE induz danos cromossômicos, causando micronúcleos em células sanguíneas quando cultivadas em níveis normais de ácido fólico, levantando preocupações sobre sua segurança (Smith-Roe et al., 2018).

O teste de micronúcleos *in vitro* (MNVit) pode ser realizado tanto por microscopia convencional quanto por citometria de fluxo. A técnica de microscopia convencional é a mais utilizada para a detecção de micronúcleos, mas requer habilidades técnicas e uma análise cuidadosa dos resultados. Já a citometria de fluxo, por outro lado, é uma técnica automatizada e objetiva, que permite a detecção e análise de um grande número de células em um curto período de tempo (Lenzi et al., 2017, 2018; Witt et al., 2008; Zhou et al., 2013).

Neste contexto, o objetivo principal desse trabalho foi comparar os resultados obtidos entre as técnicas de análise de MNVit por microscopia e por citometria de fluxo. Ao fornecer uma análise comparativa de técnicas, esse estudo oferece informações valiosas para a tomada de decisões informadas sobre a escolha das metodologias mais adequadas para avaliar o potencial genotóxico de produtos.



2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ESTABELECIMENTO DE CULTURA DE CÉLULAS V79

Alíquotas contendo 3×10^5 células V79 foram cultivadas com meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 10% de soro fetal bovino em garrafas de cultura de 75cm^2 . No momento em que as células atingiram a confluência de 80% foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 6 poços ($1,5 \times 10^5$ células por poço), para a realização do ensaio por microscopia e em placas de 96 poços (1×10^4 células por poço) para o ensaio em citometria de fluxo. As placas foram então incubadas por $24 \text{h} \pm 0,5 \text{h}$ em uma estufa de CO_2 com atmosfera de $5\% \pm 0,5\%$ de CO_2 , umidade de $90\% \pm 10\%$ e temperatura de $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

2.2 TRATAMENTO DAS CÉLULAS

O protocolo de tratamento das células foi igual para as duas formas de avaliação (por microscopia e por citometria), diferindo apenas a quantidade de reagentes, que foi calculada de forma proporcional à área dos poços.

Após 24h de incubação, o meio de cultivo foi substituído pelos tratamentos, sendo eles o controle positivo, controle negativo e controle de veículo. O controle positivo consistiu em uma solução de colchicina a $0,75 \mu\text{g}/\text{mL}$ em meio DMEM + 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), o controle negativo apenas meio DMEM + 10% de SFB, e o controle de veículo por DMSO 0,5% diluído em meio DMEM + 10% de SFB. Em cada poço da placa foram adicionados os respectivos tratamentos em triplicatas, sendo 100uL para as placas de 96 poços e 2mL para as placas de 6 poços.

Após a adição dos tratamentos, as placas foram incubadas por 3h em uma estufa de CO_2 com atmosfera de $5\% \pm 0,5\%$ de CO_2 , umidade de $90\% \pm 10\%$ e temperatura de $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

3 PROTOCOLO DA ANÁLISE POR MICROSCOPIA

3.1 EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS À CITOCALASINA B

Após o tempo de exposição aos tratamentos, as placas foram retiradas da estufa e analisadas no microscópio invertido para avaliar o aspecto das culturas quanto à presença de precipitação, morfologia e morte celular.

Após a avaliação foram submetidas ao tratamento com citocalasina B (Sigma, cód C6762), uma micotoxina que atua bloqueando a formação do anel contrátil de actina e miosina, necessária para a divisão do citoplasma e a formação de células filhas [Clique ou toque aqui para inserir o texto.](#) fazendo com que as células parem a divisão na fase da citocinese, permanecendo com dois ou mais núcleos no mesmo citoplasma (Wessells et al., 1971).

Para isso, o meio de cultura foi retirado e todos os poços com células foram lavados com tampão fosfato (PBS) por 2 vezes. Em seguida, o meio de cultura DMEM contendo citocalasina B na



concentração final de 3 $\mu\text{g/mL}$ pré-aquecido à temperatura de 37 °C foi adicionado. A placa foi homogeneizada suavemente com movimentos de circulares para evitar bolhas de ar.

As culturas foram incubadas a 37 °C e 5 % de CO_2 por 21 horas, período que corresponde a aproximadamente 1,5x o tempo do ciclo celular das células V79 para então serem submetidas ao tratamento de fixação.

3.2 FIXAÇÃO DAS CÉLULAS

O meio de cultura de cada poço foi aspirado e transferido para tubos de 15mL. Em seguida as células foram tripsinizadas e adicionadas ao tubo correspondente. As culturas foram então centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 3mL de cloreto de potássio (KCl) 0,075 M estéril previamente resfriado. Após 3 minutos no KCl, foram adicionados 500 μL do fixador para células (metanol + ácido acético, na proporção de 3:1). Na sequência, as culturas foram novamente centrifugadas por 5 minutos à 800 rpm. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e o pellet ressuspenso em 5 mL de fixador. Foram centrifugados mais uma vez e ressuspensas novamente em 5 mL de fixador.

3.3 MONTAGEM DAS LÂMINAS

As células fixadas foram homogeneizadas e 3 gotas adicionadas nas áreas centrais das lâminas previamente identificadas. Após esse processo foram colocadas inclinadas em uma capela de exaustão por 12h, a temperatura ambiente para secagem completa. Após este período foram coradas com corante panóptico.

3.4 LEITURA DAS LÂMINAS

As lâminas foram analisadas em microscópio ótico Nikon com ocular de 10x e objetiva de 40x. Sempre que necessário foi utilizada a objetiva de 100x (com óleo de imersão) para confirmar a presença de micronúcleos. A avaliação da taxa de multiplicação foi realizada a leitura das lâminas para avaliação do Índice de Replicação. Foram contadas 500 células por lâmina e registrado o número de células mononucleadas, binucleadas e multinucleadas. Para avaliação de micronúcleos foram analisadas aproximadamente 500 células binucleadas quanto à presença de micronúcleos em cada lâmina.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram feitas utilizando o software GraphPad Prisma.

Inicialmente as porcentagens de micronúcleos encontrados em cada grupo foram tabeladas e analisadas por T-test, sendo a análise não pareada e com distribuição gaussiana. Posteriormente os



todos grupos foram analisados por One-way ANOVA, sem pareamento e com comparações múltiplas das médias de cada grupo.

3.6 PROTOCOLO DO KIT MICROFLOW – ANÁLISE POR CITOMETRIA

Após 3h de incubação, os tratamentos foram removidos e a cada poço foi adicionado meio DMEM com 10% de SFB, sendo 100µL nas placas de 96 poços e 2mL nas placas de 6 poços. As placas foram então incubadas por 21h na estufa de CO₂ até serem removidas da estufa e submetidas ao protocolo do kit Microflow (Kit comercial *In Vitro MicroFlow*® (BD, Cod 562354). Para as placas de 96 poços, os reagentes foram reduzidos para 1/5 do recomendado pelo fabricante, que indica a utilização de placas de 12 poços.

De acordo com as especificações do fabricante do kit utilizado o reagente *Nucleic Acid Dye A* (monoazida de etídio ou EMA), atravessa o exterior comprometido da membrana de células apoptóticas e necróticas. Após isso, as células são lavadas e as membranas citoplasmáticas são digeridas com detergente para liberar núcleos e micronúcleos. Durante a etapa de lise, o reagente *Nucleic Acid Dye B* (SYTOX Green) é introduzido e marca toda a cromatina. Desta maneira é possível alcançar coloração diferencial da cromatina saudável versus o de células mortas ou apoptóticas.

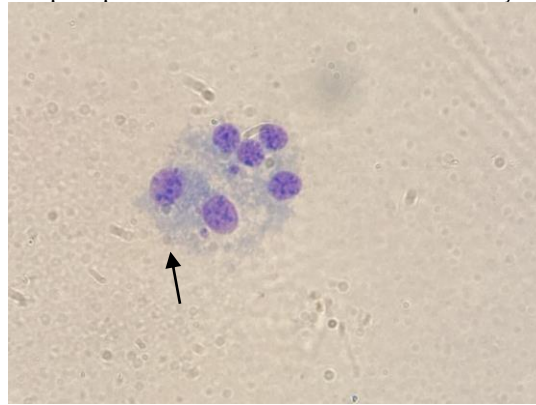
Após a realização das etapas do protocolo, foi feita a aquisição das amostras no citômetro de fluxo da marca Beckson Dickson (BD) modelo FACSVia.

4 RESULTADOS

Visando comprovar a eficácia da técnica micronúcleos *in vitro* realizada na citometria esse estudo comparou os resultados dos ensaios em citometria de fluxo com as análises em microscopia óptica (Figura 1). Para isso, foram realizados tratamentos com os controles positivo (colchicina), controle de veículo (DMSO) e controle negativo (apenas meio de cultivo). Os tratamentos foram realizados de forma igual nos experimentos para análise por microscopia e por citometria, diferindo apenas na quantidade de reagentes, que foi proporcional ao tamanho das placas de cultivo e quantidades de células utilizadas por poço.



Figura 1: Imagem obtida por microscopia óptica de célula binucleada com formação de micronúcleo indicada pela seta.



Fonte: Carla Lujan

Dados de 3 experimentos distintos foram obtidos para a análise de cada tipo de avaliação dos micronúcleos (microscopia e citometria) e a porcentagem de micronúcleos encontrada nas amostras de controle negativo, positivo e de veículo avaliadas por microscopia óptica são representadas na tabela 1.

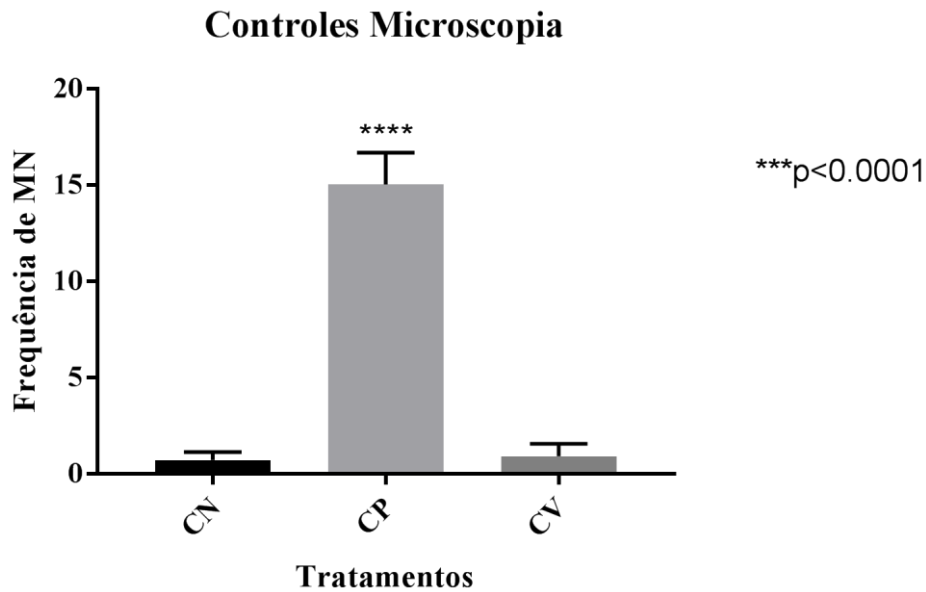
Tabela 1: Porcentagem de micronúcleos por grupos controle em cada experimento de microscopia.

	Controle Negativo	Controle de Veículo	Controle Positivo
Experimento 1	0,36%	0,33%	16,60%
Experimento 2	0,6%	0,8%	15,2%
Experimento 3	1,16%	1,6%	13,3%

Ao analisar os dados dos controles de veículo e controle negativo as diferenças das médias não foram estatisticamente relevantes. O contrário é observado ao compararmos os dois primeiros com o Controle Positivo que apresentaram diferenças estatisticamente significantes com o valor de p menor que 0,0001 (Figura 2).

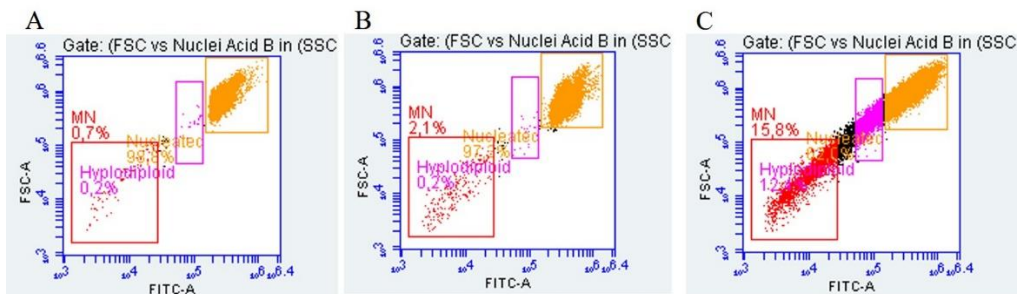


Figura 2: Análises estatísticas da frequência de micronúcleos dos grupos Controle Negativo (CN), Controle Positivo (CP) e Controle de Veículo (CV) nos experimentos de MN por microscopia. A média do controle positivo apresentou diferença significativa ($P < 0,001$) em relação aos demais grupos.



Para os experimentos de micronúcleos *in vitro* por citometria também foram utilizados os dados de 3 experimentos distintos obtidos a partir da aquisição no citômetro (BD FACSVia) de amostras tratadas com o kit MicroFlow. As células negativas para a marcação EMA e positivas para SYTOX são analisadas para a quantificação de micronúcleos. Os gates foram traçados de acordo com as recomendações do kit, sendo que os micronúcleos consistem no grupo de eventos que apresentam a fluorescência no canal de SYTOX com valores entre 1 e 10% dos encontrados no gate das células nucleadas. Os gráficos obtidos nas análises são apresentados na Figura 3.

Figura 3: Gráficos obtidos no software BD Research. Através da análise do sinal de SYTOX (FITC-A) por tamanho (FSC-A) é possível quantificar os Micronúcleos (MN – em vermelho), as células hipodiploides (em roxo) e as células nucleadas (em laranja). O gráfico A mostra as amostras de controle negativo; B o controle de veículo e C o controle positivo.



A porcentagem de micronúcleos encontrados nas amostras de Controle negativo, positivo e de veículo são representadas na tabela 2.

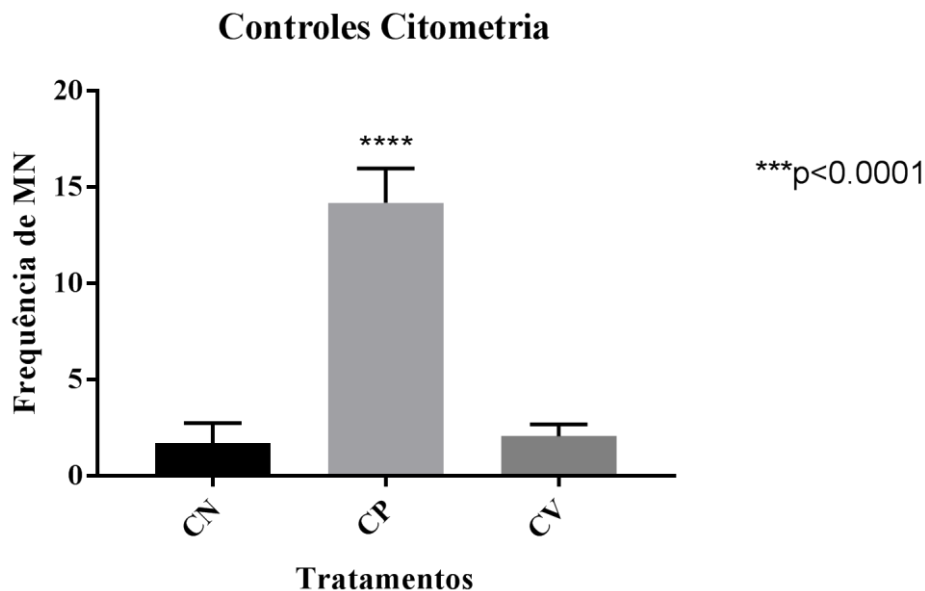


Tabela 2: Porcentagem de micronúcleos por grupos controle em cada experimento de citometria

	Controle Negativo	Controle de Veículo	Controle Positivo
Experimento 1	1,34%	2,51%	16,22%
Experimento 2	0,89%	1,33%	12,87%
Experimento 3	2,87%	2,31%	13,49%

Nos testes por citometria, assim como nos experimentos por microscopia, as análises estatísticas dos dados dos controles de veículo e controle negativo não apresentaram diferença estatística. O contrário é observado ao compararmos os dois primeiros com o Controle Positivo (Figura 4).

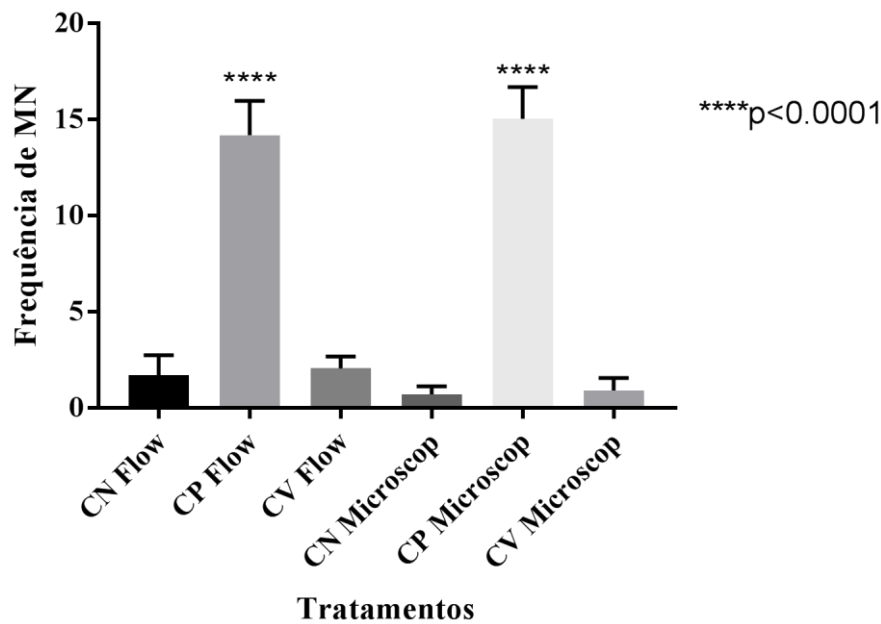
Figura 4: Análises estatísticas da frequência de micronúcleos dos grupos Controle Negativo (CN), Controle Positivo (CP) e Controle de Veículo (CV) nos experimentos de MN por citometria. A média do controle positivo apresentou diferença significativa ($P < 0,001$) em relação ao demais grupos.



Ao realizarmos as análises estatísticas comparativas das abordagens de citometria e microscopia, verificou-se uma consistência nos padrões observados. A análise dos controles negativos em ambas as técnicas não demonstrou diferenças significativas, o mesmo ocorrendo em relação aos controles de veículo. No entanto, diferenças significativas foram observadas ao compararmos os controles positivos com os controles negativos e os controles de veículo. Vale destacar que não foram identificadas diferenças significativas entre os controles positivos obtidos através das análises por microscopia e citometria. Mesmo com as diferentes abordagens empregadas para a análise dos micronúcleos, os resultados indicam ausência de diferença estatística relevante entre os controles negativos e os controles de veículo ($p > 0,001$). Diferenças de relevantes surgiram exclusivamente entre os controles positivos e os demais grupos ($p < 0,001$), sendo que tais diferenças não foram evidenciadas entre os controles positivos dos diferentes grupos ($p > 0,001$).



Figura 5: Análises estatísticas da frequência de micronúcleos dos grupos Controle Negativo (CN), Controle Positivo (CP) e Controle de Veículo (CV) nos experimentos de MN por citometria (Flow) e microscopia (Microscop). As médias dos controles positivos apresentaram diferença significativa ($P < 0,001$) em relação aos demais grupos.



4.1 OTIMIZAÇÃO DO KIT COMERCIAL *IN VITRO* MICROFLOW® (BD, COD 562354)

A quantidade de reagentes utilizada para o tratamento das células que foram analisadas por citometria foi reduzida em 1/5 em relação ao valor recomendado pelo fabricante para placas de 12 poços. Tal proporção foi escolhida afim de manter um volume mínimo de reagentes por poços e maximizar a quantidade de análises com um mesmo kit. Os resultados encontrados demonstraram que tal redução não interferiu na marcação e identificação dos micronúcleos.

5 DISCUSSÃO

Uma das principais vantagens do teste de micronúcleos *in vitro* é a possibilidade de realizar avaliações precisas e detalhadas usando células cultivadas em laboratório. Isso permite a padronização do teste, minimizando a variabilidade entre ensaios. Além disso, a utilização de células *in vitro* permite a seleção de diferentes tipos celulares, representando tecidos e órgãos específicos, o que aumenta a correspondência com o organismo humano (Lenzi et al., 2017, 2018). Acrescenta-se a isso que o uso de células *in vitro* reduz o número de animais experimentais, alinhando-se com princípios éticos e diretrizes regulatórias voltadas para a redução do uso de animais em pesquisa científica (Jennings, 2015).

O principal objetivo deste estudo foi fornecer dados de suporte ao uso da técnica de detecção de micronúcleos *in vitro* por citometria em células V79 de agentes sabidamente genotóxicos e não genotóxicos.



Nosso trabalho demonstrou a equivalência do método de MNVit quando analisado por microscopia e por citometria. Mesmo diminuindo a quantidade de reagentes e de células indicadas pelo fabricante do kit podemos comprovar que realizando o teste na citometria é possível analisar um número maior de células (10 mil eventos em citometria versus 500 células em microscopia), em poucos minutos, enquanto o teste completo realizado por um técnico na microscopia pode levar semanas, dependendo da habilidade do leitor.

Diversos trabalhos corroboram nossos dados ao demonstrarem que a eficácia do teste de micronúcleos *in vitro* é semelhante quando realizada por microscopia ou por citometria. Zhou et al., 2013, demonstraram que células primárias de medula e sangue murinos expostas à químicos genotóxicos e não genotóxicos foi capaz de gerar boa correspondência entre os dois métodos de análise. Os autores ressaltaram ainda que a citometria é um método mais rápido e objetivo do que a microscopia manual. Tal conclusão foi obtida em outros estudos utilizando diferentes células de mamíferos associadas a diferentes compostos: linfócitos humanos tratados com compostos sabidamente clastogênicos e aneugênicos (Lenzi et al., 2018); em células epiteliais de hamster (CHO-K1) tratadas com 21 compostos químicos (Shi et al., 2010); em sangue periférico de camundongos (Witt et al., 2008).

Estudos recentes criaram e validaram em alguns laboratórios um software capaz de automatizar as análises. Tal programa é capaz de quantificar os micronúcleos de células previamente marcadas com anticorpos e sondas específicas submetidas às análises em citômetro de fluxo específico, capaz de registrar imagens das células. Tais análises são baseadas nas fotografias tal qual no método de microscopia mas, com a automatização do processo elimina-se a necessidade de operador treinado nas análises e zera a diferença de leituras entre operadores (Rodrigues et al., 2021; Wills et al., 2021). Outro trabalho comparou a técnica do MicroFlow com outra técnica de avaliação semi-automática, o Metafer, para avaliar a formação de micronúcleos (MN) em células linfoblastóides humanas expostas a diferentes compostos químicos. O MicroFlow demonstrou ser comparável à abordagem Metafer em relação à sensibilidade, mas com algumas diferenças não significantes na quantificação de micronúcleos (Verma et al., 2017).

O desenvolvimento de métodos automatizados baseados em citometria para calcular as frequências de micronúcleos em células é um grande avanço tecnológico ao compararmos com métodos manuais baseados em lâminas. Ao contrário da microscopia, o método de citometria classifica as células em suspensão. Individualmente as células fluem passando por um feixe de laser focalizado, e os sinais de dispersão e fluorescência da luz são detectados pelo citômetro. Essa automação fornece números muito grandes de células micronucleadas melhorando o poder do ensaio (Lenzi et al., 2018; Ueoka et al., 2023; Zhou et al., 2013).



Outro aspecto importante é a rapidez e a eficiência do teste de micronúcleos *in vitro*. Em comparação com testes *in vivo*, o ensaio *in vitro* requer um tempo significativamente menor para fornecer resultados, aumenta a capacidade de produção e pode economizar recursos, uma vez que se elimina o tempo gasto com a mão de obra na leitura manual, o que o torna uma ferramenta valiosa em estudos de triagem (Lenzi et al., 2018; Ueoka et al., 2023; Zhou et al., 2013)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização do teste de micronúcleos *in vitro* pela técnica de citometria de fluxo demonstrou equivalência dos dados encontrados na microscopia. Aliado à essa técnica, a utilização do Kit comercial *In Vitro MicroFlow*® (BD, Cod 562354) com a redução da quantidade de reagentes se mostrou eficaz, permitindo assim a análise de mais amostras em menor tempo e com otimização de custos para o laboratório.



REFERÊNCIAS

- Bryce, S. M., Avlasevich, S. L., Bemis, J. C., Lukamowicz, M., Elhajouji, A., Van Goethem, F., De Boeck, M., Beerens, D., Aerts, H., Van Gompel, J., Collins, J. E., Ellis, P. C., White, A. T., Lynch, A. M., & Dertinger, S. D. (2008). Interlaboratory evaluation of a flow cytometric, high content in vitro micronucleus assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 650(2), 181–195. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.11.006>
- Buick, J. K., Williams, A., Gagné, R., Swartz, C. D., Recio, L., Ferguson, S. S., & Yauk, C. L. (2020). Flow cytometric micronucleus assay and TGx-DDI transcriptomic biomarker analysis of ten genotoxic and non-genotoxic chemicals in human HepaRGTM cells. *Genes and Environment*, 42(1). <https://doi.org/10.1186/s41021-019-0139-2>
- Fenech, M. (2011). Micronuclei and their association with sperm abnormalities, infertility, pregnancy loss, pre-eclampsia and intra-uterine growth restriction in humans. *Mutagenesis*, 26(1), 63–67. <https://doi.org/10.1093/MUTAGE/GEQ084>
- Jennings, P. (2015). “The future of in vitro toxicology.” *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 29(6), 1217–1221. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2014.08.011>
- Lenzi, M., Cocchi, V., & Hrelia, P. (2017). Flow Cytometry vs Optical Microscopy in the Evaluation of the Genotoxic Potential of Xenobiotic Compounds. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21546>
- Lenzi, M., Cocchi, V., & Hrelia, P. (2018). Flow cytometry vs optical microscopy in the evaluation of the genotoxic potential of xenobiotic compounds. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 94(5), 696–706. <https://doi.org/10.1002/CYTO.B.21546>
- N W N A, M., R, A., N H, K. A., E, S., M A A, K., M H, I., L K, T., & M Z, S. (2023). In vitro evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of porous nickel titanium dental implants produced by metal injection molding technique. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*. <https://doi.org/10.1002/JBM.B.35306>
- Rodrigues, M. A., Probst, C. E., Zayats, A., Davidson, B., Riedel, M., Li, Y., & Venkatachalam, V. (2021). The in vitro micronucleus assay using imaging flow cytometry and deep learning. *Npj Systems Biology and Applications* 2021 7:1, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41540-021-00179-5>
- Shi, J., Bezabhie, R., & Szkudlinska, A. (2010). Further evaluation of a flow cytometric in vitro micronucleus assay in CHO-K1 cells: A reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, 25(1), 33–40. <https://doi.org/10.1093/mutage/gep040>
- Smith-Roe, S. L., Swartz, C. D., Shepard, K. G., Bryce, S. M., Dertinger, S. D., Waidyanatha, S., Kissling, G. E., Auerbach, S. S., & Witt, K. L. (2018). Black cohosh extracts and powders induce micronuclei, a biomarker of genetic damage, in human cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 59(5), 416–426. <https://doi.org/10.1002/em.22182>
- Turkez, H., Arslan, M. E., & Ozdemir, O. (2017). Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. In *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* (Vol. 13, Issue 10, pp. 1089–1098). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1375097>
- Ueoka, A. R., Sufi, B. S., Magalhães, W. V., Fernandes, L., Andreo-Filho, N., Leite-Silva, V. R., & Lopes, P. S. (2023). Flow cytometry as an alternative method to evaluate genotoxicity of natural cosmetic actives. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 22(3), 958–968. <https://doi.org/10.1111/JOCD.15473>



Verma, J. R., Rees, B. J., Wilde, E. C., Thornton, C. A., Jenkins, G. J. S., Doak, S. H., & Johnson, G. E. (2017). Evaluation of the automated MicroFlow® and Metafer™ platforms for high-throughput micronucleus scoring and dose response analysis in human lymphoblastoid TK6 cells. *Archives of Toxicology*, 91(7), 2689. <https://doi.org/10.1007/S00204-016-1903-8>

Wessells, N. K., Spooner, B. S., Ash, J. F., Bradley, M. O., Luduena, M. A., Taylor, E. L., Wrenn, J. T., & Yamada, K. M. (1971). Microfilaments in cellular and developmental processes. *Science*, 171(3967), 135–143. <https://doi.org/10.1126/science.171.3967.135>

Wills, J. W., Verma, J. R., Benjamin, ·, Rees, J., Harte, D. S. G., Haxhiraj, ·, Qiellor, Barnes, C. M., Barnes, R., Rodrigues, M. A., Doan, M., Filby, A., Hewitt, R. E., Thornton, C. A., Cronin, J. G., Kenny, J. D., Buckley, R., Anthony, ·, Lynch, M., Carpenter, A. E., ... Johnson, G. E. (2021). Inter-laboratory automation of the in vitro micronucleus assay using imaging flow cytometry and deep learning. *Archives of Toxicology*, 95, 3101–3115. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03113-0>

Witt, K. L., Livanos, E., Kissling, G. E., Torous, D. K., Caspary, W., Tice, R. R., & Recio, L. (2008). Comparison of Flow Cytometry and Microscopy-Based Methods for Measuring Micronucleated Reticulocyte Frequencies in Rodents Treated with Nongenotoxic and Genotoxic Chemicals. *Mutation Research*, 649(1–2), 101. <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2007.08.004>

Zhou, C., Wang, Q., Wang, Z., & Chang, Y. (2013). Comparison of three-colour flow cytometry and slide-based microscopy for the scoring of micronucleated reticulocytes in rat bone-marrow and peripheral blood. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 758(1–2), 12–17. <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2013.07.010>