

Caracterização de biomarcadores de genotoxicidade em trabalhadores expostos a crómio hexavalente: um estudo no âmbito da Iniciativa Europeia em Biomonitorização Humana

Genotoxicity biomarkers in workers exposed to hexavalent chromium: a study under the European Human Biomonitoring Initiative

Ana Tavares¹, Kukka Aimonen², Sophie Ndaw³, Aleksandra Fučić⁴, Julia Catalán^{2,5}, Radu Corneliu Duca^{6,7}, Lode Godderis^{6,8}, Bruno C Gomes^{1,9}, Beata Janasik¹⁰, Carina Ladeira¹¹, Henriqueta Louro^{1,9}, Sónia Namorado¹²⁻¹⁴, An Van Nieuwenhuysse^{6,7}, Hannu Norppa², Paul T.J. Scheepers¹⁵, Célia Ventura^{1,9}, Jelle Verdonck⁶, Susana Viegas^{13,16}, Wojciech Wasowicz¹⁰, Tiina Santonen², Maria João Silva^{1,9}

m.joao.silva@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki, Finland

(3) French National Research and Safety Institute, Vandœuvre-lès-Nancy, France

(4) Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Croatia

(5) Department of Anatomy Embryology and Genetics, University of Zaragoza, 50.013 Zaragoza, Spain

(6) Centre for Environment and Health, Department of Public Health and Primary Care, University of Leuven, Leuven, Belgium

(7) Department of Health Protection, Laboratoire National de Santé (LNS), Dudelange, Luxembourg

(8) IDEWE, External Service for Prevention and Protection at Work, Heverlee, Belgium

(9) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana. NOVA Medical School, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa

(10) Department of Environmental and Biological Monitoring, Nofer Institute of Occupational Medicine, Lodz, Poland

(11) Health & Technology Research Center, Escola Superior de Tecnologia da Saúde, Instituto Politécnico de Lisboa, Portugal

(12) Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(13) Centro de Investigação em Saúde Pública. Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa Portugal

(14) Comprehensive Health Research Center, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

(15) Radboud Institute for Health Sciences, Radboudumc, Nijmegen, The Netherlands

(16) Comprehensive Health Research Center, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

No âmbito da Iniciativa Europeia em Biomonitorização Humana (HBM4EU) realizou-se um estudo ocupacional, envolvendo trabalhadores com potencial exposição a crómio hexavalente [Cr(VI)], um reconhecido agente carcinogénico. No presente estudo são apresentados os resultados de biomarcadores de genotoxicidade, incluindo a análise de lesão no DNA e de alterações cromossómicas em células sanguíneas. O estudo foi realizado em vários Países Europeus e abrangeu trabalhadores de diversos setores industriais e atividades, bem como um grupo de controlo constituído por trabalhadores administrativos das mesmas empresas (controlo interno) e de outras não relacionadas com produção/aplicação de Cr(VI) (controlo externo). Os resultados mostraram níveis de alterações cromossómicas (ensaio do micronúcleo) e de lesão no DNA (ensaio do cometa) significativamente aumentados nos trabalhadores expostos comparativamente aos controlos externos ($p=0,03$; $p<0,001$, respetivamente). Estes resultados sugerem que mesmo um baixo nível de exposição ao Cr(VI) representa um risco acrescido para a saúde dos trabalhadores e, principalmente, para os que realizam cromagem em banho. O grupo controlo interno apresentou níveis médios de lesões no DNA e nos cromossomas comparáveis aos do grupo exposto, salientando a relevância de se considerarem também em risco. O uso de biomarcadores de efeito demonstrou

ser crucial para a deteção precoce de efeitos biológicos decorrentes de baixos níveis de exposição ao Cr(VI), contribuindo para a identificação de subgrupos em maior risco. O presente estudo vem apoiar a necessidade de uma reavaliação do limite de exposição ocupacional a Cr(VI), bem como da implementação de medidas de gestão de risco conducentes a uma melhor proteção da saúde dos trabalhadores.

_Abstract

An occupational study was carried out within the scope of the European Initiative on Human Biomonitoring (HBM4EU), involving workers with potential exposure to hexavalent chromium [Cr(VI)], a recognized carcinogenic agent. In the present study, the results of biomarkers of genotoxicity are presented, including the analysis of DNA damage and chromosomal alterations in blood cells. The study was carried out in several countries and included workers from different industrial sectors and activities, as well as a control group including administrative workers from the same companies (internal control) and from others not related to the production/application of Cr(VI) (external control). Results showed significantly increased levels of chromosomal alterations (micronucleus assay) and DNA damage (comet assay) in exposed workers compared to external controls ($p=0.03$; $p<0.001$, respectively).



These results suggest that even a low level of exposure to Cr(VI) represents an increased risk for the health of workers and, mainly, for those who perform chromium bath plating. The internal control group displayed DNA and chromosomal damage levels comparable to those of the exposed group, highlighting the importance of also being considered as potentially at risk. The use of effect biomarkers proved to be crucial for the early detection of biological effects resulting from low levels of exposure to Cr(VI), contributing to the identification of subgroups at a higher risk. The present study supports the need for a reassessment of the occupational exposure limit to Cr(VI), as well as the implementation of risk management measures leading to a better protection of workers' health.

_Introdução

A exposição ocupacional a compostos de crómio hexavalente [Cr(VI)] ocorre em vários processos industriais de soldadura com metais e ligas metálicas contendo Cr, cromagem em banho eletrolítico e outros processos de tratamento de superfície (1,2,3). Apesar dos reconhecidos efeitos nefastos na saúde e das medidas regulatórias rigorosas para gerir a exposição ao Cr(VI) nos locais de trabalho, incluindo a necessidade de autorização para o uso continuado de compostos de Cr(VI) na União Europeia (Anexo XIV do regulamento REACH), esta substância é ainda muito utilizada no setor metalúrgico devido à falta de substitutos adequados para algumas das suas aplicações industriais.

A inalação de poeiras, névoas ou fumos de produtos contendo Cr constitui a principal via de exposição ocupacional (4) e o trato respiratório, principalmente o pulmão, é o principal alvo dos efeitos adversos do Cr(VI) para a saúde humana (1,5,6), sendo o Cr(VI) considerado cancerígeno para o homem (3).

No âmbito da Iniciativa Europeia em Biomonitorização Humana (HBM4EU, www.hbm4eu.eu) foi realizado um estudo transversal multicêntrico em vários países europeus, envolvendo trabalhadores de diferentes setores e atividades industriais com potencial exposição a cromatos. O referido estudo teve o objetivo de produzir novos dados harmonizados sobre a atual exposição a Cr(VI), incluindo a caracterização de um conjunto de biomarcadores de efeitos biológicos precoces.

_Objetivo

No presente estudo apresenta-se a caracterização de biomarcadores de genotoxicidade num subconjunto dos trabalhadores incluídos no estudo mais amplo, compreendendo a análise de micronúcleos (MN) em linfócitos e de lesão no DNA (ensaio do cometa) em leucócitos de sangue periférico.

_Materiais e métodos

Os trabalhadores potencialmente expostos a Cr(VI) foram selecionados em várias empresas onde se realizavam atividades de soldadura, cromagem em banho, tratamento de superfície com tintas contendo cromato ou pulverização térmica com Cr metálico aquecido (com possível formação de fumos de Cr(VI) ou maquinação de aço). Selecionaram-se como controlos indivíduos com funções administrativas dentro das mesmas empresas (controlos internos) e indivíduos externos a essas empresas (controlos externos). O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge e, também, por uma comissão de ética em cada um dos Países participantes. Cada potencial participante recebeu informação sobre o estudo e assinou um consentimento informado para a colheita e utilização de amostras biológicas. Procedeu-se também à recolha de informação contextual, incluindo dados sociodemográficos, dados sobre estilo de vida e histórico profissional e clínico através de um questionário. Pode encontrar-se informação mais detalhada sobre o desenho geral do estudo numa publicação prévia (7).

No estudo incluíram-se adultos saudáveis (18-70 anos) de ambos os sexos de cinco países, nomeadamente, Bélgica, Finlândia, Países Baixos, Polónia e Portugal. Colheu-se de cada participante uma amostra de sangue por punção venosa que foi enviada ao laboratório para análise de biomarcadores de efeito, respeitando as condições de transporte previamente estabelecidas. Todas as amostras foram pseudo-anonimizadas após colheita e chegaram já codificadas ao laboratório.



O ensaio de MN em linfócitos humanos foi realizado como descrito anteriormente (8). Para cada indivíduo, analisaram-se pelo menos 2.000 linfócitos com bloqueio da citocinese (células binucleadas, CB) para determinação da frequência de CB com micronúcleo (células micronucleadas, CBMN), de acordo com critérios publicados (9,10). Os resultados da quantificação de células binucleadas micronucleadas, entre outros parâmetros analisados, foram expressos como frequências por 1000 CB. Utilizou-se a versão alcalina do ensaio do cometa para quantificar a lesão no DNA em leucócitos dos participantes, conforme descrito anteriormente (8). As lâminas, após coloração com um fluorocromo, foram observadas em microscópio de fluorescência com auxílio de *software* específico de análise de imagem (*Comet Assay IV, Perceptive Instruments*, Reino Unido). Em cada amostra analisaram-se 100 nucleóides e as lesões no DNA foram quantificadas através da intensidade de fluorescência na “cauda” do cometa (11).

Na análise estatística dos resultados aplicaram-se testes não paramétricos de Kruskal-Wallis (KW) e Mann-Whitney (MW), dado que os resultados dos biomarcadores de efeito analisados não apresentaram uma distribuição normal. A influência de potenciais variáveis de confundimento nos resultados foi analisada através de análises de regressão linear múltipla. Em qualquer das análises considerou-se estatisticamente significativo um valor de p inferior a 0,05.

_Resultados e discussão

Analisou-se a frequência de micronúcleos e a percentagem de lesão no DNA em grupos de, respetivamente, 284 e 117 participantes do estudo. As características sociodemográficas e de estilo de vida do total de participantes e após a sua distribuição em grupos “exposto” e “controlo” por biomarcador de efeito, são apresentadas na [tabela 1](#).

Os resultados dos biomarcadores de genotoxicidade analisados em células sanguíneas dos trabalhadores expostos a Cr(VI) e dos controlos estão representados nos [gráficos 1 e 2](#).

A análise estatística da frequência média de CBMN não revelou diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de todos os trabalhadores expostos e o de todos os controlos. No entanto, a comparação do mesmo parâmetro entre o grupo exposto e o grupo de controlo externo mostrou uma frequência média de CBMN significativamente aumentada no grupo exposto ($p=0,033$). Em relação aos resultados do ensaio do cometa, o grupo exposto apresentou um nível significativamente aumentado de lesão no DNA, em comparação com os grupos controlo total e controlo externo ($p=0,014$ e $p<0,001$, respetivamente). Estes resultados estão de acordo com outros estudos em trabalhadores expostos a Cr(VI) (12,13), mostrando que apesar dos níveis atuais de exposição serem baixos, ainda se identificam efeitos genotóxicos em células sanguíneas, indicando um efeito sistémico.

Para além disso, observaram-se diferenças estatisticamente significativas na frequência de CBMN e na percentagem de lesão no DNA entre os subgrupos de controlo interno e externo relativamente os parâmetros analisados ($p<0,001$). É de notar que os controlos externos foram recrutados apenas em Portugal e Finlândia. Por outro lado, os controlos externos portugueses ($n=18$) apresentaram níveis significativamente mais baixos de CBMN ($p<0,001$) do que os controlos finlandeses ($n=15$), situando-se no intervalo de valores previamente descrito em meta-análises (14,15).



Tabela 1: Características sociodemográficas dos participantes no estudo.

Variáveis independentes	Participantes com dados de micronúcleos em linfócitos n (%)			Participantes com dados de lesões no DNA (ensaio cometa) n (%)		
	Total de participantes	Total de trabalhadores	Total de controlos	Total de participantes	Total de trabalhadores	Total de controlos
N	284	191 (67,3)	93 (32,7)	117	74 (63,2)	43 (36,8)
País de origem						
Bélgica	69 (24,3)	48 (25,1)	21 (22,6)	29 (24,8)	16 (21,6)	13 (30,2)
Finlândia	56 (19,7)	33 (17,3)	23 (24,7)	20 (17,1)	14 (18,9)	6 (14,0)
Países Baixos	30 (10,6)	20 (10,5)	10 (10,8)			
Polónia	71 (25,0)	52 (27,2)	19 (20,4)	8 (6,8)	5 (6,8)	3 (7,0)
Portugal	58 (20,4)	38 (19,9)	20 (21,5)	60 (51,3)	39 (52,7)	21 (48,8)
Género						
Feminino	35 (12,3)	7 (3,7)	28 (30,1)	15 (12,8)	5 (6,8)	10 (23,3)
Masculino	249 (87,7)	184 (96,3)	65 (69,9)	102 (87,2)	69 (93,2)	33 (76,7)
Idade						
Média ± DP	42,0 ± 10,4	41,1 ± 11,0	43,6 ± 8,9	43,5 ± 9,9	42,8 ± 11,0	44,6 ± 7,9
Min-max	20-68	20-68	23-63	20-64	20-64	30-60
Hábitos tabágicos	279			112		
Fumador	78 (28,0)	69 (36,9)	12 (13,0)	29 (25,9)	22 (31,4)	7 (16,7)
Ex-fumador	35 (12,5)	46 (24,6)	13 (14,1)	24 (21,4)	18 (25,7)	6 (14,3)
Fumador	166 (59,5)	72 (38,5)	67 (72,8)	59 (52,7)	30 (42,9)	29 (69,0)
Consumo de álcool	279			112		
Sem consumo	51 (18,3)	34 (18,2)	17 (18,5)	30 (26,8)	21 (30,0)	9 (21,4)
Baixo	114 (40,9)	79 (42,2)	35 (38,0)	30 (26,8)	13 (18,6)	17 (40,5)
Elevado	114 (40,9)	74 (36,9)	40 (43,5)	52 (46,4)	36 (51,4)	16 (38,1)
Tipologia de área de residência	279			112		
Urbana	199 (71,3)	130 (69,5)	69 (75,0)	84 (75,0)	55 (78,6)	29 (69,0)
Rural	80 (28,7)	57 (30,5)	23 (25,0)	28 (25,0)	15 (21,4)	13 (31,0)
Residência em área industrial	275			112		
Não	206 (74,9)	134 (73,2)	72 (78,3)	89 (79,5)	54 (77,1)	35 (83,3)
Sim	69 (25,1)	49 (26,8)	20 (21,7)	23 (20,5)	16 (22,9)	7 (16,7)
Densidade de tráfego na área de residência	279			109		
Baixa	139 (49,8)	96 (51,3)	43 (46,7)	59 (52,7)	37 (52,9)	22 (52,4)
Média	113 (40,5)	70 (37,4)	43 (46,7)	42 (37,5)	25 (35,7)	17 (40,5)
Elevada	27 (9,7)	21 (11,2)	6 (6,5)	11 (9,8)	8 (11,4)	3 (7,1)



Gráfico 1 ▾ **Frequência média de células binucleadas micronucleadas por 1000 células binucleadas (CBMN/1000 CB) em trabalhadores expostos a Cr(VI) e em controlos, estratificados de acordo com as suas atividades.**

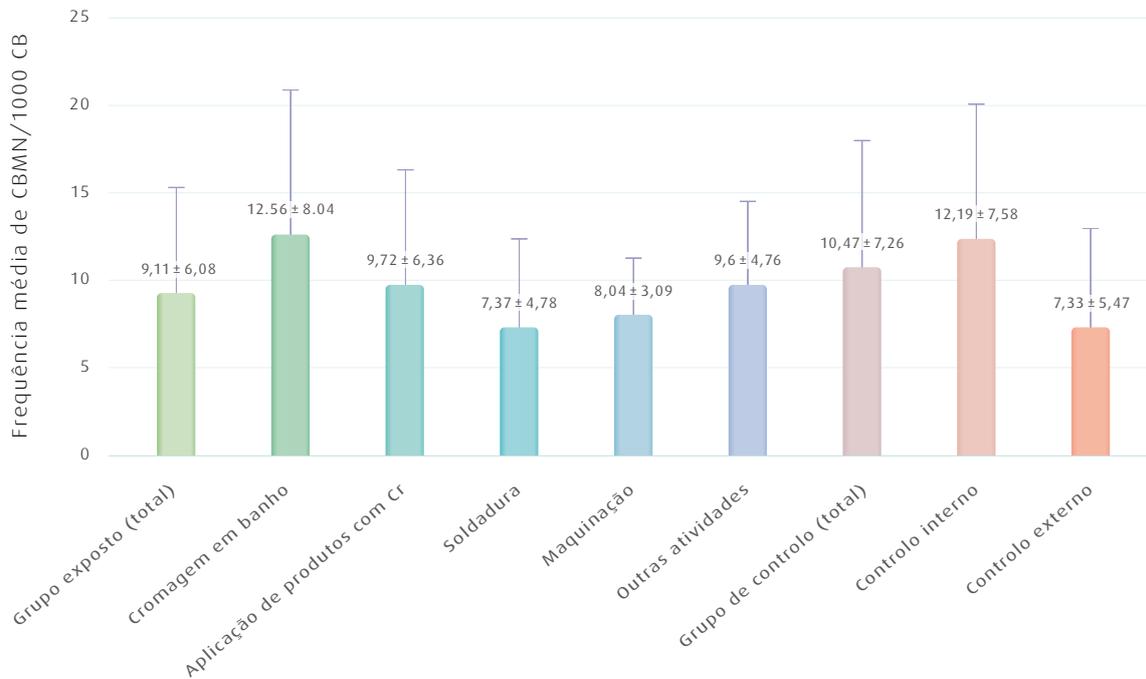
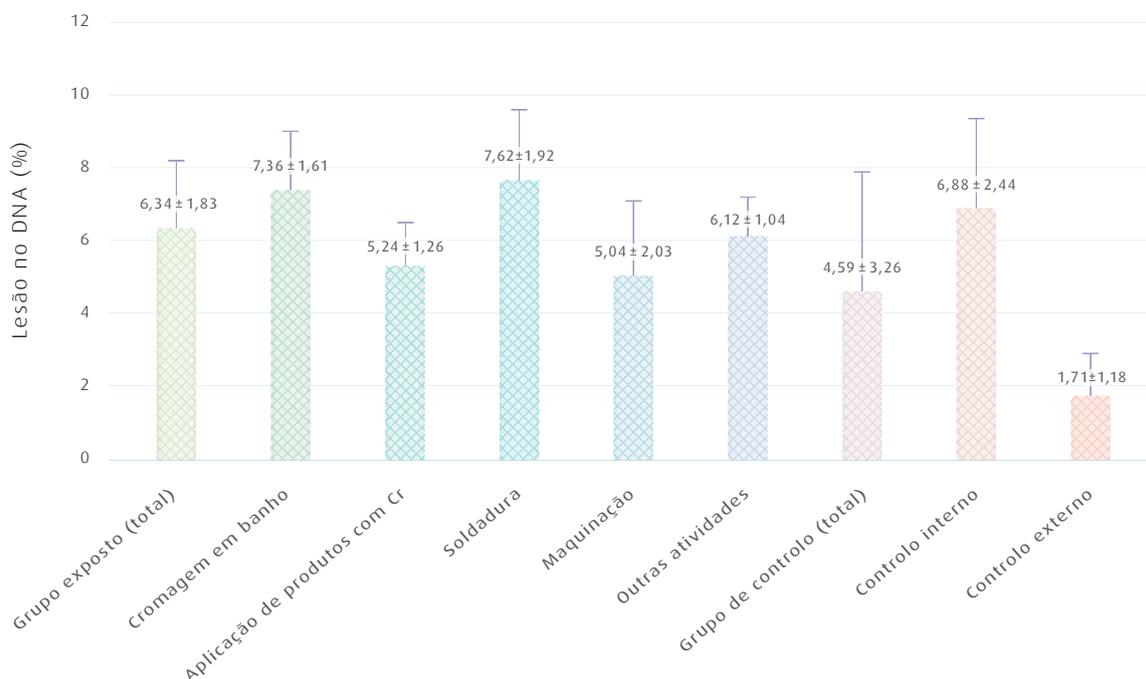


Gráfico 2 ▾ **Percentagem de lesão no DNA avaliada pelo ensaio do cometa em leucócitos sanguíneos de trabalhadores expostos a Cr(VI) e controlos, estratificados de acordo com as suas atividades.**





Após a desagregação dos participantes por atividade realizada, detetaram-se diferenças estatisticamente significativas na frequência de CBMN ([gráfico 1](#)) e na percentagem de lesão no DNA entre os vários subgrupos de trabalhadores ($p \leq 0,001$, teste KW). Uma análise estatística emparelhada mostrou que os trabalhadores envolvidos na cromagem em banho, apresentaram a frequência mais elevada de CBMN e um elevado nível de lesão no DNA, indicando instabilidade genética. Estes resultados estão em concordância com o nível de exposição a Cr(VI) mais elevado nestes trabalhadores, tal como foi previamente descrito ([16](#)). Por sua vez, os soldadores apresentaram os níveis mais elevados de lesão no DNA. Avaliou-se ainda uma possível influência do nível de crómio urinário (U-Cr) em cada biomarcador de efeito. Para tal calculou-se o valor médio de CBMN e a percentagem de lesão no DNA em três grupos de trabalhadores estratificados por tercís do nível de U-Cr. Ao considerar todos os participantes, a frequência média de CBMN apresentou uma associação significativa com a concentração de U-Cr ($7,90 \pm 5,24$, $8,54 \pm 5,38$ e $11,1 \pm 7,09$ estimados para o 1º, 2º e 3º tercís de U-Cr, respetivamente; $p=0,001$). O U-Cr afetou também o nível de lesão no DNA ($4,71 \pm 2,89$, $5,55 \pm 2,35$ e $6,76 \pm 1,61$ para o 1º, 2º e 3º tercís de U-Cr, respetivamente; $p=0,002$).

Os resultados dos diferentes biomarcadores de efeito foram explorados à luz das informações sobre fatores sociodemográficos e de estilo de vida, para avaliar a influência das diferentes variáveis independentes (por exemplo, país, idade, sexo, consumo de tabaco ou álcool) nas variáveis dependentes avaliadas, ou seja, CBMN e percentagem de lesão no DNA. Os resultados da análise mostraram que o género, faixa etária e consumo de álcool afetaram significativamente os resultados de CBMN, sendo que se verificou uma frequência superior nas mulheres relativamente aos homens ($p=0,004$), no grupo acima de 50 anos relativamente ao grupo mais jovem ($p=0,014$) e no subgrupo que referiu elevado consumo de álcool em comparação com os subgrupos de baixo consumo e sem consumo ($p < 0,001$).

_Conclusões

No presente estudo, os biomarcadores de efeito contribuíram para a interpretação dos dados dos biomarcadores de exposição e foram mais além, auxiliando na identificação de grupos de risco que não haviam sido capturados pela análise dos biomarcadores de exposição. Um exemplo paradigmático foi fornecido pelos controlos internos (recrutados entre os funcionários administrativos das indústrias envolvidas no estudo) que apresentaram níveis de alterações genéticas nas células sanguíneas acima do esperado para um grupo “controlo”. Esta descoberta não só suporta a sua exposição a baixos níveis de Cr(VI), como também sugere que este tipo de exposição tem efeitos biológicos adversos e, portanto, pode resultar no desenvolvimento de doença a mais longo termo. Embora seja necessário prosseguir a investigação para confirmar esse achado e averiguar os fatores que podem explicá-lo, deverão ser implementadas medidas de intervenção com vista à proteção da saúde desses trabalhadores.

O facto de se terem identificado alterações genéticas em células sanguíneas dos trabalhadores expostos a Cr(VI) e, particularmente, dos trabalhadores envolvidos na cromagem em banho, sugere que os baixos níveis de Cr(VI) a que se encontram expostos ainda poderão representar um risco para a sua saúde. Assim, este estudo reforça a necessidade de uma reavaliação do limite de exposição ocupacional, bem como das medidas de gestão de risco conducentes a uma melhor proteção da saúde dos trabalhadores.

Agradecimentos:

Os autores agradecem a todo o grupo internacional envolvido no estudo ocupacional de exposição a cromatos *HBM4EU chromates study group*. É também devido um agradecimento às indústrias e a todos os voluntários que participaram no estudo.

Financiamento:

Este projeto recebeu financiamento do programa de investigação e inovação Horizonte 2020 da União Europeia sob o acordo de subvenção nº 733032 e recebeu cofinanciamento das organizações dos autores.



Referências bibliográficas:

- (1) Annangi B, Bonassi S, Marcos R, et al. Biomonitoring of humans exposed to arsenic, chromium, nickel, vanadium, and complex mixtures of metals by using the micronucleus test in lymphocytes. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2016 Oct-Dec;770 (Pt A): 140-161. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.03.003>
- (2) European Commission. Scientific Committee on Occupational Exposure Limits. SCOEL/REC/386 Chromium VI compounds: Recommendation. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2017. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/75d27056-893f-11e7-b5c6-01aa75ed71a1>
- (3) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Arsenic, Metals, Fibres and Dusts: Chromium (VI) compounds. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2012 (v. 2018);100 (Pt C):147-67. <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono100C-9.pdf>
- (4) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Chemical agents and related occupations. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2012 (v.2018);100(Pt F):9-562. <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono100F.pdf>
- (5) Ventura C, Gomes BC, Oberemm A, et al. Biomarkers of effect as determined in human biomonitoring studies on hexavalent chromium and cadmium in the period 2008-2020. *Environ Res*. 2021 Jun;197:110998. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110998>
- (6) Alvarez CC, Bravo Gómez ME, Hernández Zavala A. Hexavalent chromium: Regulation and health effects. *J Trace Elem Med Biol*. 2021 May;65:126729. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126729>
- (7) Santonen T, Alimonti A, Bocca B, et al. Setting up a collaborative European human biological monitoring study on occupational exposure to hexavalent chromium. *Environ Res*. 2019 Oct;177:108583. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108583>
- (8) Vital N, Antunes S, Louro H, et al. Environmental Tobacco Smoke in Occupational Settings: Effect and Susceptibility Biomarkers in Workers From Lisbon Restaurants and Bars. *Front Public Health*. 2021 Jun 4;9:674142. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.674142>
- (9) Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, et al; HUMAN Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*. 2003 Jan 10;534(1-2):65-75. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(02\)00249-8](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(02)00249-8)
- (10) Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2007;2(5): 1084-104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
- (11) Collins AR. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Feb;1840(2):794-800. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.022>. Epub 2013 Apr 22.
- (12) Junaid M, Hashmi MZ, Malik RN, et al. Toxicity and oxidative stress induced by chromium in workers exposed from different occupational settings around the globe: A review. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016 Oct;23(20):20151-20167. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7463-x>
- (13) Sudha S, Kripa SK, Shibily P, et al. Elevated Frequencies of Micronuclei and other Nuclear Abnormalities of Chrome Plating Workers Occupationally Exposed to Hexavalent Chromium. *Iran J Cancer Prev*. 2011 Summer;4(3):119-24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4551294/>
- (14) Fenech M, Holland N, Zeiger E, et al. The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells-past, present and future. *Mutagenesis*. 2011 Jan;26(1):239-45. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq051>
- (15) Milić M, Ceppi M, Bruzzone M, et al. The hCOMET project: International database comparison of results with the comet assay in human biomonitoring. Baseline frequency of DNA damage and effect of main confounders. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2021 Jan-Jun;787:108371. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108371>
- (16) Santonen T, Porras SP, Bocca B, et al.; HBM4EU chromates study team. HBM4EU chromates study – Overall results and recommendations for the biomonitoring of occupational exposure to hexavalent chromium. *Environ Res*. 2022 Mar;204 (Pt A):111984. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111984>. Epub 2021 Sep 4.