



## INVESTIGAÇÃO

# Quantificação do dano ao DNA mitocondrial e número de cópias no sangue circulante de pacientes com esclerose sistêmica em um ensaio baseado em qPCR ☆,☆☆



Shafieh Movassaghi <sup>a</sup>, Sara Jafari <sup>a</sup>, Kowsar Falahati <sup>b</sup>, Mitra Ataei <sup>b</sup>,  
Mohammad Hossein Sanati <sup>b</sup> e Zohreh Jadali <sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Reumatologia, Hospital Imam Khomeini, Tehran University of Medical Sciences, Teerã, Irã

<sup>b</sup> Departamento de Genética Clínica, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Teerã, Irã

<sup>c</sup> Faculdade de Saúde Pública, Tehran University of Medical Sciences, Teerã, Irã

Recebido em 24 de abril de 2019; aceito em 12 de novembro de 2019

Disponível na Internet em 17 de maio de 2020

### PALAVRAS-CHAVE

Autoimunidade;  
DNA mitocondrial;  
Esclerodermia  
sistêmica;  
Estresse oxidativo;  
Reação em cadeia da  
polimerase em tempo  
real

### Resumo

**Fundamentos:** Embora não totalmente compreendido, o estresse oxidativo tem sido associado à patogênese de diferentes doenças autoimunes, como a esclerose sistêmica. A evidência acumulada indica que o estresse oxidativo pode induzir danos no DNA mitocondrial (mtDNA) e variações no número de cópias do mtDNA (mtDNAcn).

**Objetivo:** Explorar o mtDNAcn e subprodutos de danos oxidativos ao DNA no sangue periférico de pacientes com esclerose sistêmica e em controles saudáveis.

**Métodos:** O estudo incluiu 46 pacientes com esclerose sistêmica e 49 indivíduos saudáveis. PCR quantitativa em tempo real foi usada para mensurar o mtDNAcn relativo e o dano oxidativo (purinas oxidadas) de cada amostra.

**Resultados:** O mtDNAcn médio foi menor em pacientes com esclerose sistêmica do que nos controles, enquanto o grau de dano ao mtDNA foi significativamente maior nos doentes em comparação com os controles. Além disso, observou-se correlação negativa entre o mtDNAcn e o dano oxidativo ao DNA.

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2019.11.003>

☆ Como citar este artigo: Movassaghi S, Jafari S, Falahati K, Ataei M, Sanati MH, Jadali Z. Quantification of mitochondrial DNA damage and copy number in circulating blood of patients with systemic sclerosis by a qPCR-based assay. An Bras Dermatol. 2020;95:314–9.

☆☆ Trabalho realizado no Tehran University of Medical Sciences, Teerã, Irã.

\* Autor para correspondência.

E-mail: [zjadali@yahoo.co.uk](mailto:zjadali@yahoo.co.uk) (Z. Jadali).

*Limitações do estudo:* A falta de análise e quantificação simultânea de marcadores de dano oxidativo ao DNA no soro ou na urina de pacientes com esclerose sistêmica e em controles saudáveis.

*Conclusão:* Esses dados sugerem que a alteração no mtDNAcn e o aumento do dano oxidativo ao DNA podem estar envolvidos na patogênese da esclerose sistêmica.

© 2020 Sociedade Brasileira de Dermatologia. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Introdução

A esclerose sistêmica (ES) é doença crônica rara do tecido conjuntivo caracterizada por vasculopatia e fibrose na pele e em vários órgãos internos.<sup>1,2</sup> Sua causa exata é desconhecida, mas sua ocorrência pode ser influenciada por uma interação complexa de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais.<sup>3</sup> Recentemente, grande atenção tem sido dedicada ao papel do estresse oxidativo na patogênese da ES. Acredita-se que ele esteja envolvido nos processos fisiopatológicos de aumento da síntese e acúmulo de matriz extracelular, ativação imune anormal e dano endotelial vascular, as três principais características da ES.<sup>4,5</sup>

O aumento do estresse oxidativo reflete um desequilíbrio entre a homeostase pró-oxidante/antioxidante e leva a níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio (ERO) tóxicas. Existem duas vias principais de geração de ERO: endógena e exógena. As mitocôndrias são a principal fonte endógena de ERO. Elas têm seu próprio genoma (DNA mitocondrial [mtDNA]) e são organelas indispensáveis para a fisiologia celular normal. O mtDNA é multicópias e sua abundância é regulada de forma específica em cada tipo de tecido. O mtDNAcn flutua em resposta ao ambiente fisiológico ao redor da célula; em condições fisiológicas, permanece relativamente estável dentro das células.<sup>6</sup> Em circunstâncias patológicas, o mtDNAcn pode variar, depende de diferentes fatores, inclusive o equilíbrio redox celular alterado. O mtDNA também é propenso a danos por estresse oxidativo devido à sua alta exposição aos EROs produzidos pelas mitocôndrias.<sup>7</sup>

Os produtos de oxidação da guanina são importantes indicadores de dano oxidativo ao DNA. Esses marcadores químicos podem ser removidos por Fpg (DNA-formamidopirimidina glicosilase), uma enzima de reparo por excisão de base que libera lesões de purina, tanto do DNA nuclear quanto do mtDNA.<sup>7,8</sup> A clivagem por Fpg do DNA oxidativamente danificado pode reduzir a amplificação do DNA alvo digerido pela enzima Taq DNA polimerase.<sup>9</sup> Portanto, esse método tem sido amplamente usado como uma medida de dano oxidativo ao DNA. Os objetivos do presente estudo foram determinar se a variação do mtDNAcn e seu índice de dano oxidativo (mtDNA [ $\Delta$ CT]) podem ser detectados em pacientes com ES.

## Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Ciências Médicas e foi feito de acordo com os princípios de ética da Declaração de Helsinque. Todos os participan-

tes concordaram voluntariamente em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

## População do estudo

O estudo incluiu 46 pacientes com ES e 49 indivíduos saudáveis pareados por idade e sexo, sem histórico de esclerodermia ou outras doenças crônicas e autoimunes. Os pacientes com ES foram diagnosticados de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR)/Liga Europeia Contra Reumatismo (EULAR) de 2013.<sup>10,11</sup> Entre os pacientes incluídos, seis (13,04%) apresentavam forma limitada de ES e 40 (86,96%) ES difusa. Doze (26,09%) apresentavam doença pulmonar intersticial (DPI), três (6,52%) hipertensão arterial pulmonar (HAP) e três (6,52%) DPI e HAP. A idade média dos pacientes com ES (seis homens, 40 mulheres) e os controles (cinco homens, 44 mulheres) foi de 46,09 e 41,90 anos, respectivamente. A duração média da doença foi de  $7,61 \pm 6,13$  anos, com variação de um a 40 anos. Trinta e oito pacientes com ES difusa e seis pacientes com ES cutânea limitada haviam recebido tratamento com esteroides e/ou imunossuppressores antes da amostragem. A dose e a duração do tratamento foram diferentes, dependeram da gravidade das lesões e dos órgãos afetados. Nenhum dos pacientes apresentava doenças inflamatórias/autoimunes além da ES e todos estavam inativos no momento da visita. A **tabela 1** apresenta as características demográficas e clínicas dos pacientes com ES e controles.

## Extração de DNA

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de 5 mL com ácido etileno diamino tetraacético (EDTA). O DNA do sangue total foi extraído com o kit de isolamento de DNA (GeneAll – Seul, Coreia), de acordo com as instruções do fabricante.

A concentração e purificação do DNA extraído foram medidas com eletroforese em gel de agarose (1,5%) e espectrofotometria com NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, EUA). Todas as amostras de DNA foram armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$  até o uso.

## Preparação do modelo de DNA

Para a detecção de dano oxidativo, 100 ng de DNA da amostra (2  $\mu\text{L}$  de solução-padrão) foram incubados por 1 h a  $37^\circ\text{C}$  em 10  $\mu\text{L}$  de mistura de reagente com uma unidade de enzima FPG (New England BioLabs – Massachusetts, EUA), 10 mM Bis Tris Propano-HCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT e 0,1 mg/mL de albumina de soro bovino. Para a detecção

**Tabela 1** Características demográficas e clínicas de pacientes com esclerose sistêmica e controles saudáveis

Características	Pacientes	Controles
Número	46	49
Idade (anos)	46,09±12,70	41,90±12,23
Duração da doença (anos)	7,61±6,13	
Sexo (Feminino/Masculino)	40/6	44/5
lcSSc/dcSSc, n (%)	6 (13,04%)/40 (86,96%)	0
<b>Órgãos afetados</b>		
Pele	30	0
Pulmão (DPI)	17	0
Coração (HAP)	10	0
Rim (Histórico de crise renal)	1	0
Gastrointestinal	20	0
Articulações	5	0
<b>Tratamento</b>		
Tipo de doença	Medicamento	Número de pacientes
Esclerose sistêmica cutânea limitada	Metotrexato	4
	Azatioprina	1
	Micofenolato	1
Esclerose sistêmica difusa	Metotrexato	6
	Azatioprina	10
	Micofenolato	14
	Prednisolona	1
	Azatioprina + prednisolona	7
	Nenhum	2

do mtDNAcn, o DNA da amostra foi preparado de maneira semelhante, mas sem FPG.

### Determinação quantitativa do número de cópias do mtDNA

As reações para o ensaio quantitativo de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) foram feitas com o kit SYBR Premix EX Taq II (Takara – Japão) e com um aparelho Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science – Austrália). A PCR foi feita em 42 ciclos, com uma desnaturação inicial de 1 min a 95 °C no primeiro ciclo. Todos os ciclos subsequentes consistiram em desnaturação a 95 °C por 4s, emparelhamento a 62 °C por 30s e extensão a 72 °C por 15s, bem como uma etapa final de extensão a 72 °C por 15s.

As reações de PCR foram feitas em um volume total de 10 µL com 1 µL de DNA genômico, 0,5 µL de cada iniciador, 5 µL de SYBR Premix e 3 µL de água destilada.

Para quantificação de mtDNA, foi usado um conjunto de iniciadores direcionados à subunidade NADH desidrogenase tipo 2 codificada mitocondrialmente (ND2). Para quantificação nuclear de DNA, um conjunto de iniciadores direcionados ao gene da β-actina foi selecionado. Todos

os iniciadores foram comprados na Gene Fanavaran Company (Teerã, Irã) e suas sequências exatas foram descritas anteriormente.<sup>12</sup> A proporção de mtDNA para DNA nuclear em cada amostra foi calculada como uma estimativa para o número de mtDNA.

### Determinação quantitativa do dano ao mtDNA

O conteúdo de produtos de oxidação de guanina foi determinado pela técnica baseada em qPCR. O nível de dano oxidativo no DNA mitocondrial é indicado por um aumento dos nucleotídeos de purina oxidados, inclusive 8-OHdG. A digestão com FPG foi usada para a detecção de produtos do dano oxidativo no DNA. Os níveis de dano oxidativo ao mtDNA foram apresentados como ΔCt, que é a diferença entre os valores do ciclo limiar (Ct) entre as amostras tratadas com enzima e as não tratadas com enzima (Ct-T e Ct-N, respectivamente). Valores mais elevados de ΔCt indicam níveis mais altos de estresse oxidativo nas mitocôndrias.

### Análise estatística

Os dados distribuídos normalmente e não normalmente foram analisados pelo teste *t* para amostras independentes e pelo teste U de Mann-Whitney, respectivamente. Os níveis de dependência linear entre duas variáveis foram calculados pelo coeficiente de correlação de Pearson. Esse teste é adequado para variáveis contínuas normais; valores-*p* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados experimentais foram apresentados como média ± desvio-padrão. O software SPSS (v11.0; SPSS, Inc. Chicago, IL, EUA) foi usado para as operações estatísticas e interpretação dos resultados do estudo.

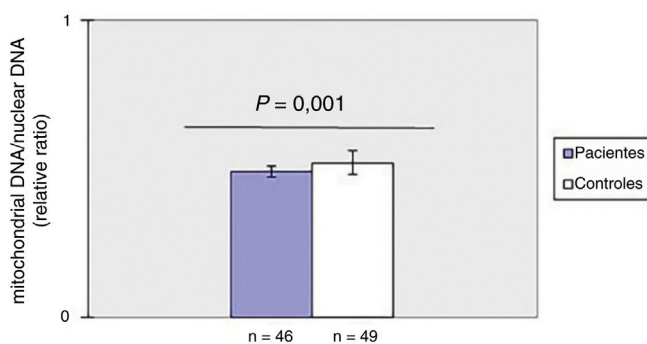
### Resultados

#### Diminuição do mtDNAcn no sangue periférico em pacientes com ES

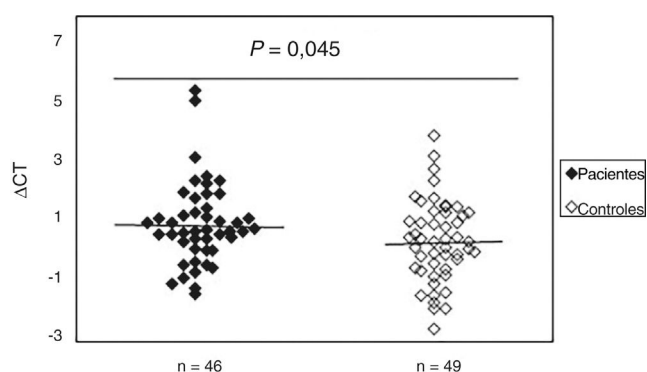
Como mostrado na figura 1, o mtDNAcn do sangue periférico diminuiu significativamente ( $p=0,001$ ) no grupo de pacientes ( $0,49 \pm 0,02$ ) em comparação com o grupo controle ( $0,52 \pm 0,04$ ). Não foi observada associação entre mtDNAcn e idade, sexo e duração da doença. Além disso, não houve diferença significativa no mtDNAcn entre os pacientes com doença limitada e difusa ( $p > 0,05$ ).

#### Aumento do dano oxidativo ao DNA em pacientes com ES

Para avaliar a existência de dano oxidativo, a presença de bases de purinas oxidadas (principalmente 8-oxodGuo), que são locais sensíveis à FPG, foi determinada no DNA de amostras de sangue periférico de pacientes com ES e controles normais. Os resultados indicaram (fig. 2) que o valor médio do dano oxidativo ao DNA em pacientes ( $0,99 \pm 1,40$ ) aumentou significativamente ( $p=0,045$ ) em comparação ao grupo controle ( $0,42 \pm 1,37$ ). Além disso, não foi observada associação entre dano oxidativo ao DNA e idade, sexo e duração da doença. A análise estatística também não



**Figura 1** Número médio de cópias mitocondriais no sangue periférico de pacientes com esclerose sistêmica e indivíduos saudáveis. O número de cópias do DNAm<sub>t</sub> foi quantificado com o delta Ct (Ct) da Ct média do DNAm<sub>t</sub> e o DNA nuclear (Ct = CtmtDNA + Ctactin).



**Figura 2** Aumento do dano ao DNAm<sub>t</sub> em pacientes com esclerose sistêmica em comparação aos controles normais. O Ct é a diferença entre o valor de Ct da amostra de DNA tratada com FPG e o valor de Ct da amostra de DNA sem tratamento com FPG. Observe que um valor mais alto de Ct corresponde a níveis comparativamente mais altos desses danos oxidativos.

indicou diferenças significativas entre os pacientes com ES limitada e difusa em termos de dano oxidativo ao DNA ( $p > 0,05$ ). Curiosamente, observou-se uma correlação negativa entre o mtDNACn e o dano oxidativo ao DNA ( $r = -0,392$ ,  $p = 0,007$ ).

## Discussão

Há um consenso geral de que a ES é doença autoimune e que a complexidade de sua imunopatogênese é similar à de outras doenças autoimunes.<sup>13</sup> Sua etiologia exata não é clara. No entanto, estudos recentes apontam a importância da influência do estresse oxidativo nos processos da doença. Por exemplo, Bourji et al. mostraram que pelas fibróticas e não fibróticas de pacientes com ES apresentam níveis mais altos de ERO do que as de controles saudáveis. Eles também observaram que pacientes com ES apresentavam níveis mais baixos de vitamina C (que tem poderosa atividade antioxidante) do que os controles saudáveis.<sup>14</sup> O aumento da produção de ERO por fibroblastos, células endoteliais e células T, os principais agentes celulares na patogênese da ES, é outra evidência que associa o estresse oxidativo

aos principais eventos da doença, como fibrose e dano vascular.<sup>15</sup>

Existem muitas vias distintas para a geração de ERO. As mitocôndrias são as principais fontes de ERO e, ao mesmo tempo, os principais alvos de seus efeitos desfavoráveis. A maior parte das ERO mitocondriais decorre da cadeia de transporte de elétrons, como subproduto do processo de respiração aeróbica.<sup>16</sup> As ERO agem como uma faca de dois gumes, porque sua geração descontrolada promove estresse oxidativo que causa lesões graves em tipos básicos de macromoléculas biológicas, inclusive DNA, proteínas, carboidratos e lipídios. Por outro lado, a ERO pode participar de vários processos biológicos em células normais, inclusive vias de sinalização celular e respostas imunes contra patógenos ou substâncias estranhas.<sup>17</sup>

Nos últimos anos, vários estudos examinaram o impacto da variação quantitativa e qualitativa do mtDNACn em doenças humanas e demonstraram alterações notáveis no mtDNACn em várias doenças.<sup>12,18</sup> O mtDNACn pode ser modificado pelo estresse oxidativo. Além disso, o aumento da produção de ERO pode causar danos oxidativos aos componentes celulares, inclusive o DNA.<sup>6</sup> Portanto, a avaliação do mtDNACn e de seu índice de dano oxidativo melhorará o entendimento sobre a patogênese de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como a ES.

Os resultados do presente estudo indicaram que o valor médio do mtDNACn foi significativamente menor do que o observado em controles normais. Tanto quanto é do conhecimento dos autores, este é o primeiro relato que mediu as alterações do mtDNACn no sangue periférico de pacientes com ES. Atualmente, existem poucas informações sobre a relação entre alterações bioquímicas, estruturais e funcionais nas mitocôndrias e ES.

Um relato de Feldmann et al. indicou a presença de mitocôndrias gigantes nos hepatócitos de pacientes com escleroderma sistêmica. Entretanto, esses autores não forneceram explicação sobre o(s) mecanismo(s) por trás desse evento celular.<sup>19</sup> Alguns pesquisadores também relataram a presença de anticorpos antimitocôndrias (AMAs) nos soros de pacientes com ES. Esses anticorpos são encontrados em até 25% dos pacientes<sup>20</sup> e atuam contra componentes da multienzima piruvato desidrogenase complexa (PDHC),<sup>21</sup> que está localizada na matriz mitocondrial interna e produz substratos reduzidos para a cadeia de transporte de elétrons.<sup>22</sup> Os AMAs são considerados um marcador sérico de doenças autoimunes, como a cirrose biliar primária (CBP).<sup>23</sup> A motivação clínica por trás da avaliação dos AMAs em pacientes com ES foi a observação de que uma grande proporção desses pacientes apresentava uma condição autoimune coexistente, inclusive CBP.<sup>24</sup>

Vários outros autoanticorpos, inclusive anticorpos anti-centrômero (ACA), anti-topoisomerase (ATA) e anti-RNA polimerase III (anti-RNAP), foram descritos em pacientes com ES como possíveis bons biomarcadores para várias manifestações clínicas e prognósticas em subconjuntos de ES.<sup>25</sup>

Existem também algumas evidências de associação positiva entre esses anticorpos e AMA. Por exemplo, Wielose et al. concluíram que a prevalência de ACAs é significativamente maior em pacientes com ES que apresentam títulos positivos de AMA do que naqueles com títulos negativos de AMA.<sup>26</sup> Este estudo também apontou uma forte associação

entre AMAs e ACAs em pacientes com ES cutânea limitada, o que é consistente com relatos anteriores.<sup>27</sup>

Esses achados sugerem indiretamente que as mitocôndrias podem estar envolvidas na ES, além de sugerir um possível papel para o estresse oxidativo. Essa hipótese é reforçada por outras observações. Por exemplo, a análise do fluido obtido na lavagem broncoalveolar (LBA) de pacientes com ES e fibrose pulmonar (SSc<sub>Fib+</sub>) indicou significativa suprarregulação da topoisomerase 1 do DNA mitocondrial (mtDNA TOP1),<sup>28</sup> uma enzima que tem papel funcional na manutenção e na topologia do mtDNA.<sup>29</sup> Além disso, foi observada infrarregulação da glutathione S-transferase P (GSTP) e superóxido dismutase (SOD) no LBA de pacientes com SSc<sub>Fib+</sub>.<sup>28</sup> É importante mencionar que SOD e GSTP são dois componentes do sistema de defesa antioxidante que protege as células e os tecidos contra oxidantes, especialmente no pulmão.<sup>30,31</sup>

Os produtos de danos oxidativos em bases de DNA também servem como marcadores de estresse oxidativo; entre as quatro bases nitrogenadas no DNA, a guanina é a base de ácido nucleico mais facilmente oxidável. Portanto, a guanina é alvo primário de modificação oxidativa<sup>32</sup> e a medição de espécies de guanina oxidada pode ser uma ferramenta útil para avaliar os danos ao DNA induzidos pelo estresse oxidativo nos compartimentos nuclear e mitocondrial.

No presente estudo, o teste qPCR foi usado para avaliar a oxidação da base de DNA nas células sanguíneas periféricas de pacientes com ES e controles saudáveis.

Os resultados indicaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados em relação ao dano oxidativo do mtDNA. Além disso, uma correlação negativa significativa foi observada entre o mtDNA<sub>cn</sub> e o grau de mtDNA oxidativo ( $r = -0,392$ ,  $p = 0,007$ ).

Esses resultados são similares aos de estudos anteriores que relataram aumento do estresse oxidativo e danos ao DNA em fibroblastos obtidos de pacientes com ES (esclerodermia).<sup>33,34</sup>

Embora o mecanismo molecular exato do dano ao DNA ainda não tenha sido elucidado, aparentemente os autoanticorpos derivados de pacientes com ES podem estimular várias vias de sinalização intracelular (como as vias Wnt e Ras) que podem ser influenciadas pelos ERO e também podem ter impacto na produção de ERO. Nesse cenário, alterações descontroladas na produção de ERO e na transdução de sinal podem resultar em acúmulo de danos ao DNA, ativação de genes dependentes de ERO e alta suscetibilidade à apoptose. Acredita-se que esses eventos participem da formação de fibrose tecidual como consequência da apoptose e da deposição de colágeno.<sup>35</sup>

## Conclusão

O presente estudo avaliou os danos ao mtDNA<sub>cn</sub> e ao mtDNA com um ensaio quantitativo baseado em PCR. Os presentes resultados indicam que pacientes com ES apresentavam redução no mtDNA<sub>cn</sub> e aumento no dano mitocondrial, o que é consistente com a disfunção mitocondrial. Além de experimentos tradicionais para desvendar a fisiopatologia da ES, estudos futuros são necessários para confirmar os presentes achados.

## Suporte financeiro

Universidade de Ciências Médicas de Teerã (contrato nº 24.743).

## Contribuição dos autores

Shafieh Movassaghi: Aprovação da versão final do manuscrito; participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados.

Sara Jafari: Aprovação da versão final do manuscrito; participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados.

Kowsar Falahati: Aprovação da versão final do manuscrito; obtenção, análise e interpretação dos dados.

Mitra Aataei: Aprovação da versão final do manuscrito; obtenção, análise e interpretação dos dados.

Mohammad Hossein Sanati: Aprovação da versão final do manuscrito; revisão crítica do manuscrito.

Zohreh Jadali: Análise estatística; aprovação da versão final do manuscrito; concepção e planejamento do estudo; elaboração e redação do manuscrito; obtenção, análise e interpretação dos dados; participação efetiva na orientação da pesquisa; participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

## Conflitos de interesse

Nenhum.

## Referências

1. Freire M, Rivera A, Sopena B, Tolosa Vilella C, Guillén-Del Castillo A, Colunga Argüelles D, et al. Clinical and epidemiological differences between men and women with systemic sclerosis: a study in a Spanish systemic sclerosis cohort and literature review. *Clin Exp Rheumatol*. 2017;35:89–97.
2. Barsotti S, Bruni C, Orlandi M, Della Rossa A, Marasco E, Codullo V, et al. One year in review 2017: systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2017;35 Suppl 106:3–20.
3. Walczyk M, Paradowska-Gorycka A, Olesinska M. Epigenetics: The Future Direction in Systemic Sclerosis. *Scand J Immunol*. 2017;86:427–35.
4. Grygiel-Górniak B, Puszczewicz M. Oxidative damage and anti-oxidative therapy in systemic sclerosis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:389582.
5. Vona R, Giovannetti A, Gambardella L, Malorni W, Pietraforte D, Straface E. Oxidative stress in the pathogenesis of systemic sclerosis: An overview. *J Cell Mol Med*. 2018;22:3308–14.
6. Lee SR, Han J. Mitochondrial Nucleoid: Shield and Switch of the Mitochondrial Genome. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8060949.
7. Alexeyev M, Shokolenko I, Wilson G, LeDoux S. The maintenance of mitochondrial DNA integrity – critical analysis and update. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5, a012641.
8. O'Connor TR, Laval J. Physical association of the 2,6-diamino-4-hydroxy-5N-formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli* and an activity nicking DNA at apurinic/apyrimidinic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:5222–6.
9. Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:1–14.

10. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2013;72:1747–55.
11. Hudson M, Fritzler MJ. Diagnostic criteria of systemic sclerosis. *J Autoimmun*. 2014;48–49:38–41.
12. Vaseghi H, Houshmand M, Jadali Z. Increased levels of mitochondrial DNA copy number in patients with vitiligo. *Clin Exp Dermatol*. 2017;42:749–54.
13. Fuschiotti P. Current perspectives on the immunopathogenesis of systemic sclerosis. *Immunotargets Ther*. 2016;5:21–35.
14. Bourji K, Meyer A, Chatelus E, Pincemail J, Pigatto E, Defraigne JO, et al. High reactive oxygen species in fibrotic and nonfibrotic skin of patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2015;87:282–9.
15. Amico D, Spadoni T, Rovinelli M, Serafini M, D'Amico G, Campelli N, et al. Intracellular free radical production by peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic sclerosis: role of NADPH oxidase and ERK1/2. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:68.
16. Georgieva E, Ivanova D, Zhelev Z, Bakalova R, Gulubova M, Aoki I. Mitochondrial Dysfunction and Redox Imbalance as a Diagnostic Marker of "Free Radical Diseases". *Anticancer Res*. 2017;37:5373–81.
17. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863:2977–92.
18. Zhu X, Mao Y, Huang T, Yan C, Yu F, Du J, et al. High mitochondrial DNA copy number was associated with an increased gastric cancer risk in a Chinese population. *Mol Carcinog*. 2017;56:2593–600.
19. Feldmann G, Maurice M, Husson JM, Fiessinger JN, Camilleri JP, Benhamou JP, et al. Hepatocyte giant mitochondria: an almost constant lesion in systemic scleroderma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1977;374:215–27.
20. Gupta RC, Seibold JR, Krishnan MR, Steigerwald JC. Precipitating autoantibodies to mitochondrial proteins in progressive systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 1984;58:68–76.
21. Ceribelli A, Isailovic N, De Santis M, Generali E, Satoh M, Selmi C. Detection of anti-mitochondrial antibodies by immunoprecipitation in patients with systemic sclerosis. *J Immunol Methods*. 2018;452:1–5.
22. Patel MS, Nemeria NS, Furey W, Jordan F. The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation. *J Biol Chem*. 2014;289:16615–23.
23. Cancado ELR, Harriz M. The Importance of Autoantibody Detection in Primary Biliary Cirrhosis. *Front Immunol*. 2015;6:309.
24. Imura-Kumada S, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Encabo S, Shums Z, et al. High prevalence of primary biliary cirrhosis and disease-associated autoantibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Mod Rheumatol*. 2012;22:892–8.
25. Valentini G, Marcocchia A, Cuomo G, Iudici M, Vettori S. The concept of early systemic sclerosis following 2013 ACR/EULAR criteria for the classification of systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rev*. 2014;10:38–44.
26. Wielosz E, Majdan M, Koszarny A, Dryglewska M, Tabarkiewicz J. Presence of organ specific antibodies in patients with systemic sclerosis. *Pol Arch Med Wewn*. 2016;126:862–9.
27. Cavazzana I, Ceribelli A, Taraborelli M, Fredi M, Norman G, Tin-cani A, et al. Primary biliary cirrhosis-related autoantibodies in a large cohort of Italian patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2011;38:2180–5.
28. Fietta A, Bardoni A, Salvini R, Passadore I, Morosini M, Cavagna L, et al. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid proteome from systemic sclerosis patients with or without functional, clinical and radiological signs of lung fibrosis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8:R160.
29. Zhang H, Pommier Y. Mitochondrial topoisomerase I sites in the regulatory D-loop region of mitochondrial DNA. *Biochemistry*. 2008;47:11196–203.
30. Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, Matsui H, Miyao M, Hosoi T, et al. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1999;54:693–6.
31. Liu X, Chen Z. The pathophysiological role of mitochondrial oxidative stress in lung diseases. *J Transl Med*. 2017;15:207.
32. Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat AG, Douki T, Duarte V, et al. Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol Chem*. 2002;383:933–43.
33. Svegliati S, Cancellato R, Sambo P, Luchetti M, Paroncini P, Orlandini G, et al. Platelet-derived growth factor and Reactive Oxygen Species (ROS) regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1/2 Amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblasts. *J Biol Chem*. 2005;280:36474–82.
34. Svegliati S, Marrone G, Pezone A, Spadoni T, Grieco A, Moron-cini G, et al. Oxidative DNA damage induces the ATM-mediated transcriptional suppression of the Wnt inhibitor WIF-1 in systemic sclerosis and fibrosis. *Sci Signal*. 2014;7, ra84.
35. Yamamoto T. Scleroderma – pathophysiology. *Eur J Dermatol*. 2009;19:14–24.