



REVISIÓN

La miopatía isquémica en la enfermedad arterial periférica

F. Vaquero Morillo*, M. Ballesteros Pomar y M.C. Fernández Morán

Servicio de Vascular. Complejo Asistencial de León. León. España.

Recibido el 17 de marzo de 2010; aceptado el 20 de marzo de 2010

PALABRAS CLAVE

Daño oxidativo;
Enfermedad arterial
periférica;
Miopatías
mitocondriales

KEY WORDS

Oxidative stress;
Peripheral arterial
disease;
Mitochondrial myopathy

Resumen

Introducción. La mitocondria afectada por la isquemia provoca una miopatía y un aumento de radicales libres de oxígeno (RLO), que conduce a daño oxidativo y activación del proceso inflamatorio, ambos asociados al fenómeno isquemia-reperusión.

Objetivo. Estudiar la alteración mitocondrial del músculo estriado, provocada por la isquemia, y sus repercusiones en la enfermedad arterial periférica (EAP).

Métodos. Estrategia de búsqueda avanzada en Pub-Med (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pub-Med>) y búsqueda manual de bibliografía.

Desarrollo. Los principales trabajos consultados indican la existencia de una disfunción mitocondrial característica con alteración de los complejos de la cadena respiratoria. Esto conduce a un incremento de RLO que dañan el ADN mitocondrial, perpetuándose el círculo vicioso de empeoramiento de cadena respiratoria-daño oxidativo-alteración del ADN mitocondrial, al estar los complejos CI, CIII y CIV codificados por el ADN mitocondrial lesionado.

Conclusión. Se necesitan más trabajos para comprender la miopatía isquémica provocada por la disminución del flujo en la EAP.

© 2010 FSEACV. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Ischaemic myopathy of peripheral arterial occlusive disease

Abstract

Introduction. Ischemic injury involves a mitochondrial dysfunction causing a typical myopathy and an increase of free radicals. It may lead to oxidative tissue injury and activation of inflammatory response, both of them in relation to reperfusion ischemia injury.

Aim. To study mitochondrial impairment in skeletal muscle as a consequence of ischemia and effects of mitochondrial dysfunction in peripheral arterial disease (PAD).

Methods. Advanced search strategy: PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>) and manual literature search.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fernandovaquero@ono.com (F. Vaquero Morillo).

Results. The main studies reviewed indicate that there is a mitochondrial dysfunction having special characteristics. Dysfunctions in the electron transport chain lead to increased production of reactive oxygen species which cause damage to mitochondrial DNA, launching a vicious cycle of worsening electron transport chain disruption-oxidant production-further mitochondrial deterioration since impaired complex are encoded by damaged mitochondrial DNA.

Conclusion. Further work is required to understand ischemic miopathy as a consequence of a decreased blood flow in PAD.

© 2010 FSEACV. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción y objetivos

Enfermedad arterial periférica (EAP) es la traducción literal del término anglosajón empleado para describir la afectación oclusiva producida por la aterosclerosis sobre las arterias de las extremidades; podemos considerarla equivalente a la isquemia crónica aterosclerótica de los miembros inferiores. La prevalencia total de la enfermedad basada en pruebas objetivas se ha informado en algunos estudios epidemiológicos que oscila entre el 3-10%, con un incremento hasta del 15-20% en los individuos de más de 70 años¹⁻³.

Parte de la aparente falta de concordancia de los datos sobre la prevalencia de la EAP sintomática se debe a la metodología con que se estudia la muestra analizada; pero, en resumen, cabe concluir que por cada paciente con EAP sintomática, hay otros 3 o 4 individuos con enfermedad que no cumplen los criterios clínicos de claudicación intermitente⁴.

Los signos y síntomas clásicos de la EAP incluyen claudicación, dolor en reposo y lesiones tróficas en los grados más avanzados. Son la consecuencia de los déficits bioenergéticos y del daño oxidativo tisular de la enfermedad, cuando afecta a los miembros inferiores.

La mitocondria es la organela celular que se encarga de la producción de energía, por lo que parece lógico estudiar su funcionamiento y posibles alteraciones, como el menor rendimiento energético y sus consecuencias, cuando resulta afectada por la enfermedad isquémica. El daño oxidativo tisular también se relaciona con disfunción mitocondrial; parece ser secundario al incremento en la producción de los radicales libres de oxígeno (RLO), así como por activación del proceso inflamatorio; ambos procesos están asociados al fenómeno isquemia-reperusión.

En los últimos años la mitocondria, por su papel clave en el metabolismo celular, ha sido el centro de atención de distintos equipos de investigación, lo que ha permitido la producción de un importante cuerpo de material científico, hasta el punto que se ha acuñado un nuevo término, como es la miopatía isquémica (miopatía mitocondrial) de la EAP^{5,6}.

Con la revisión en profundidad de esta posible patología queremos contribuir a su conocimiento y discusión debido a las importantes repercusiones que puede tener en el contexto de la EAP.

Métodos

Hemos realizado una búsqueda avanzada en PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>) introduciendo los

términos “peripheral arterial disease”, “myopathy”, “mitochondria”, según la estrategia de búsqueda siguiente:

((“peripheral vascular diseases”[MeSH Terms] OR (“peripheral”[All Fields] AND “vascular”[All Fields] AND “diseases”[All Fields]) OR “peripheral vascular diseases”[All Fields] OR (“peripheral”[All Fields] AND “arterial”[All Fields] AND “disease”[All Fields]) OR “peripheral arterial disease”[All Fields]) AND (“peripheral vascular diseases”[MeSH Terms] OR (“peripheral”[All Fields] AND “vascular”[All Fields] AND “diseases”[All Fields]) OR “peripheral vascular diseases”[All Fields] OR (“peripheral”[All Fields] AND “arterial”[All Fields] AND “disease”[All Fields]) OR “peripheral arterial disease”[All Fields])) AND (“mitochondria”[MeSH Terms] OR “mitochondria”[All Fields]). Con esto se han obtenido 64 publicaciones.

Se acotó la búsqueda a la combinación de los términos “peripheral arterial disease”, “myopathy”, “mitochondria”, según la siguiente estrategia:

((“peripheral vascular diseases”[MeSH Terms] OR (“peripheral”[All Fields] AND “vascular”[All Fields] AND “diseases”[All Fields]) OR “peripheral vascular diseases”[All Fields] OR (“peripheral”[All Fields] AND “arterial”[All Fields] AND “disease”[All Fields]) OR “peripheral arterial disease”[All Fields]) AND (“muscular diseases”[MeSH Terms] OR (“muscular”[All Fields] AND “diseases”[All Fields]) OR “muscular diseases”[All Fields] OR “myopathy”[All Fields])) AND (“mitochondria”[MeSH Terms] OR “mitochondria”[All Fields]). De esta forma se han recuperado 15 publicaciones.

Asimismo se han incorporado artículos encontrados mediante una revisión no sistemática de la literatura. De esta manera queremos contribuir al conocimiento y discusión de esta posible nueva patología que puede tener importantes repercusiones en el contexto de la EAP.

Desarrollo

Mitocondria: recuerdo fisiológico

Las mitocondrias son las encargadas de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular, son las verdaderas minicentrales energéticas de la célula y sintetizan el adenosín trifosfato (ATP) por medio de la fosfori-

lación oxidativa. Su número o condrioma celular depende de las necesidades energéticas de la célula.

Todos los nutrientes se escinden en el citoplasma celular para transformarse en último término en ácido pirúvico, que penetra en la mitocondria a través del ciclo de Krebs; el ácido pirúvico reacciona con el agua para producir CO_2 y 10 átomos de hidrógeno; estos átomos se transportan a través de las crestas de la membrana interna, por un sistema de coenzimas. Una vez allí, las coenzimas donan los hidrógenos a una serie de proteínas enlazadas en la membrana que forman la cadena de transporte de electrones (CTE).

Esta cadena está compuesta por 4 complejos enzimáticos fijos y dos transportadores de electrones móviles, además del llamado complejo V (canal de $\text{H} + \text{ATP}$ sintasa). Permite el paso de los protones de hidrógeno otra vez a la matriz mitocondrial, añadiendo un grupo fosfato al compuesto de difosfato de adenosina (ADP), para formar ATP en el proceso llamado fosforilación.

Según la teoría quimiosmótica de Mitchell, la energía liberada por el transporte de electrones se utiliza para bombear protones desde la matriz al espacio intermembrana, a través de los transportadores localizados en los complejos enzimáticos de los sistemas I, II, III. De esta forma se genera un gradiente electroquímico de protones que ejerce lo que se conoce como fuerza protonmotriz, ya que cuando los protones atraviesan la membrana interna a favor de gradiente a través de la ATP sintetasa, la energía protonmotriz se transformará en energía de enlace de tres moléculas de ATP.

El ATP se libera en el citoplasma de la célula, que la utiliza en todas las reacciones que precisan energía; se convierte en ADP que la célula devuelve a la mitocondria para volver a fosforilarla.

Mitocondria: cambios histológicos

Cuando se observa al microscopio óptico el músculo esquelético de los claudicantes, se encuentran cambios importantes, incluyendo necrosis, inflamación y fagocitosis, alteraciones nucleares y fibrosis del endomisio. Además de estos cambios propios de miopatía, se acompañan concomitantemente cambios neuropáticos con evidencia de que las miofibrillas están inmersas en un proceso de atrofia y denervación⁷.

Cuando este mismo músculo es analizado en alta resolución, a través del microscopio electrónico, se reconoce de forma temprana que la organela predominantemente afectada es la mitocondria. Específicamente muestra una constelación de cambios cualitativos: aumento de tamaño, reorientación transversa, hipertrofia de las crestas, inclusiones paracrystalinas y vacuolización lipídica. Los cuantitativos consisten en: hiperplasia, grandes agrupaciones en el subsarcolemma y pequeñas electrodensidades⁸.

El enigma de la claudicación intermitente

Cuando a las pocas semanas interrogamos a los pacientes revascularizados que han recuperado completamente los índices tobillo/brazo sobre la evolución de su claudicación anterior, la respuesta habitual es que no tienen que pararse.

No obstante, algunos autores se permiten discrepar de esta visión puramente hemodinámica. En un pequeño trabajo Gardner y Killewich⁹ sostienen que a pesar de la normalización de los parámetros hemodinámicos después de una revascularización exitosa, en ocasiones no se llega a recuperar la marcha como antes, ni tampoco los parámetros de fuerza y potencia muscular, observándose solo un modesto incremento en la capacidad funcional referida a la distancia de claudicación y al consumo pico de oxígeno a los 6 y 20 minutos de la prueba de marcha. Pero estos pacientes no eran claudicantes puros, padecían isquemia crítica avanzada en el sector femoropoplíteo.

De manera similar otros estudios también han demostrado que el éxito de la revascularización sólo produce una mínima o ninguna mejoría en la función de la fosforilación oxidativa en la mitocondria, y que igualmente el músculo esquelético de estos pacientes, evaluado con pruebas isométricas diseñadas especialmente, no demuestra los cambios que deberían esperarse tras la recuperación del flujo sanguíneo¹⁰.

McDermott et al¹¹ miden la fuerza muscular en estos pacientes usando una prueba que durante 5 segundos mide la máxima tensión isométrica. Esta prueba muestra que la fuerza muscular es claramente independiente del flujo muscular. La fuerza muscular está significativamente disminuida, lo que puede indicar que la claudicación muscular en la EAP es el resultado de una combinación de factores, porque 5 segundos de ejercicio empleando la máxima fuerza de contracción no justifican una restricción aguda del flujo.

Por otra parte, si el flujo sanguíneo fuese el único responsable de la capacidad funcional muscular, su incremento o normalización debería restablecer la función.

El ejercicio entrenado reduce la respuesta inflamatoria aguda asociada a la claudicación, aumentando la distancia de marcha libre de dolor¹², pero es posible que no esté únicamente relacionada con la hemodinámica arterial. La percepción por parte del paciente de su claudicación no es la misma cada día, ni tampoco al comenzar la marcha, o a diferentes horas del día. La distancia es variable dentro de unos márgenes interiorizados.

Cuando se valoran los índices tobillo-brazo (ITB) durante el reposo y después del ejercicio, anotando cuidadosamente la distancia inicial libre de dolor y la distancia de claudicación hasta que el mismo obliga a detenerse, observan que los datos no siempre se correlacionan con los ITB, por lo que describen un modelo de regresión que incluye otros parámetros¹³.

En otro estudio aleatorizado¹⁴ se constató que a pesar de mejorar el triple la distancia de claudicación en el grupo de entrenamiento sobre el grupo control, el flujo muscular medido por Xenon 133 en ambos grupos no mostró ninguna mejoría, lo que demuestra que el flujo no es el único determinante de la función muscular en este tipo de pacientes.

Todos estos estudios demuestran que el flujo sanguíneo y la liberación de oxígeno no son los únicos factores limitantes de la función muscular en los pacientes con EAP. La isquemia mantenida puede poner en marcha una serie de procesos a nivel de la célula muscular, específicamente a nivel mitocondrial, que podemos englobar dentro del concepto de miopatía isquémica o miopatía mitocondrial^{5,6,10}, hecho que puede ayudar a explicar las limitaciones funcionales de los pacientes claudicantes.

Alteraciones en los intercambios gaseosos y miopatía

Cuando se mide el volumen de oxígeno corporal consumido durante el ejercicio en pacientes sanos y con claudicación intermitente, se puede observar que la disminución expresada en volumen de oxígeno consumido por kg/min es un 40-60% menor en estos últimos¹⁵. En ausencia de enfermedad pulmonar que presente un obstáculo a los intercambios, se acepta que la mayoría del oxígeno consumido es por la demanda del tejido muscular.

Bauer¹⁶, por medio de la espectroscopia infrarroja, estudia 6 pacientes sanos y 6 con EAP, en prueba de cinta rodante de máximo esfuerzo, colocando la sonda sobre el músculo gemelo. Este método refleja la oxigenación local del tejido. Las principales diferencias entre los sanos y los claudicantes es que la desaturación es más rápida en los sanos y se recupera mucho antes, mientras en los claudicantes es algo más lenta, pero sobre todo la recuperación se prolonga de forma significativa (tiempos de desaturación de $21,9 \pm 9,4$ seg y $4,9 \pm 2,2$ seg; $p < 0,01$). Estos cambios metabólicos pueden explicarse porque en los pacientes isquémicos la función mitocondrial estaría disminuida, produciéndose una forma de miopatía que alteraría la respuesta al ejercicio.

Estos datos abundarían en el concepto de que nos encontramos ante una miopatía isquémica que contribuiría a explicar, al menos en parte, las limitaciones al ejercicio en los pacientes con EAP.

Cambios bioquímicos sugestivos de disfunción mitocondrial

Podemos evaluar en vivo de manera no invasiva los cambios bioenergéticos mitocondriales usando resonancia magnética nuclear espectroscópica (RMNS) por medio del fósforo (P31). Este método nos permite valorar en tiempo real los valores en la concentración de ATP, ADP, fosfocreatina (Pcr) y el pH intracelular, antes, durante y después del ejercicio¹⁰.

Es sabido que durante el ejercicio el ATP se descompone en ADP y fosfato, obteniendo la energía necesaria para la contracción muscular. Al final del mismo los niveles de ADP son altos y de Pcr bajos. La fosforilación oxidativa ocurre exclusivamente en la mitocondria y allí, durante el reposo, se deben restablecer los niveles de ATP, siendo estos niveles de recuperación los mejores indicadores para medir la función mitocondrial. Numerosas investigaciones llevadas a cabo por este método han demostrado, de forma significativa, prolongados retrasos en la recuperación de los niveles normales de ADP y Pcr^{17,18}, lo que significa que existe una función mitocondrial disminuida.

Se ha apuntado alguna crítica⁵ a estos trabajos porque el ejercicio isotónico prolongado vaciaría las reservas energéticas, lo que induciría cierta confusión, pero también se ha observado que incluso con un perfil bajo de ejercicio, la disfunción mitocondrial aparece en forma de retraso en la fosforilación oxidativa.

De manera similar, en dos estudios que comparan el metabolismo muscular antes y después de la revascularización exitosa del miembro se aprecia que la bioenergética muscular muestra poca mejoría¹⁹, o regular²⁰, persistiendo en la mitocondria el déficit bioenergético, a pesar de la normalización de los parámetros hemodinámicos y del flujo muscular.

La reducción en la fosforilación oxidativa que se ve en las mitocondrias del músculo de los pacientes con EAP es similar a la que se observa en otras miopatías¹⁷. También se ha encontrado que cuanto más grave es el grado de afectación isquémica del miembro, mayor es el grado de disfunción mitocondrial^{10,19}.

Evidencias *in vitro* sugestivas de disfunción mitocondrial

Cuando se mide la respiración mitocondrial de manera basal y tras la estimulación del ciclo de Krebs con sustratos y ADP, podemos observar en los pacientes con EAP, en comparación con los sanos, el decrecimiento del consumo de oxígeno en las miofibrillas del músculo esquelético, apuntando a que un defecto en la cadena respiratoria sea el origen de la disfunción mitocondrial²¹.

Durante el proceso de combustión energética, se calcula que produce el 90% de los RLO, que directa o indirectamente pueden acabar afectando a su función energética. Los dos lugares donde mayor cantidad de RLO se generan es en los complejos I y III (CI y CIII) de la CTE, y el daño mitocondrial, especialmente en esos complejos, aumenta exponencialmente la producción de RLO^{5,6}.

Se pueden analizar separadamente los complejos de la CTE para estudiar sus posibles defectos. Es posible analizar la función de cada complejo a través de respirometría *in vitro*. Adicionalmente, cada complejo también se evalúa a través de su actividad enzimática por técnicas de espectrofotometría.

Se han encontrado defectos en los complejos CI, CIII y CIV en pacientes con EAP, con una reducción significativa de la respiración mitocondrial, valorada en el 17, 30 y 17% de disminución, así como de la menor actividad enzimática del 22, 15 y 32%, respectivamente²².

Estos hallazgos son particularmente importantes porque muestran una clara disminución funcional de la mitocondria y confirman la realidad de la disfunción mitocondrial.

La combinación de estudios de respirometría y espectrofotometría *in vitro*, con los hallazgos en vivo por RMNE y las pruebas de ejercicio realizadas directamente a los pacientes, muestran la conexión lógica entre los defectos de los complejos de la CTE, el compromiso de la respiración mitocondrial, la disminución de la producción de energía oxidativa en el músculo esquelético y el bajo rendimiento para el ejercicio en los pacientes con EAP²³.

Daño oxidativo mitocondrial

Existe controversia sobre el papel que desempeñan las defensas antioxidantes celulares, especialmente en los pacientes con EAP. Las principales son: la superóxido dismutasa (SO4D), la glutatión peroxidasa (GPO) y la catalasa (CAT); cada una independientemente es capaz de neutralizar RLO y transformarlos en especies menos reactivas. El papel de la vitamina C como antioxidante, y el de los metales Fe y Cu como catalizadores de formas altamente reactivas, está en discusión²³.

Aunque por una parte se ha demostrado un incremento importante de la oxidación de proteínas y peroxidación lipídica de las membranas de las células musculares en los pacientes con EAP, consecuencia de los productos del cata-

bolismo que contiene sustancias oxidativas dañinas, por otra parte, la superóxido manganeso dismutasa (SODMn), que es la primera línea defensiva antioxidante de la célula, también se ha encontrado disminuida²⁴. Esto significa que los sistemas antioxidantes no son capaces de responder adecuadamente a la anormalmente elevada producción de RLO, lo que conduce, al no contrarrestarlos, al daño oxidativo de carácter significativo de las proteínas y membranas lipídicas del músculo.

Sin embargo, en otro trabajo podemos encontrar que la concentración en suero de SO4D, GPO y CAT, y su actividad, no es diferente en los pacientes isquémicos de la de los controles²⁵, por lo que parece ineludible profundizar en las investigaciones que confirmen el papel de las defensas antioxidantes.

Clásicamente se admite que para que se produzca una enfermedad degenerativa muscular mediada por daño mitocondrial se deben dar tres condiciones⁵:

1. Incremento en la producción de RLO.
2. Daño en el ADN mitocondrial (ADNmt).
3. Progresiva disfunción de la CTE.

Específicamente los complejos CI, CIII y CIV de la CTE están comprometidos de manera significativa en los pacientes con EAP^{22,23}. Sin embargo, el CII no resulta afectado en estos casos. Curiosamente debemos señalar que el CII es el único complejo que se codifica íntegramente a través de ADN nuclear, mientras que el ADNmt controla parcialmente al resto, a través de la codificación de 13 proteínas de los complejos CI, CIII y CIV^{26,27}.

Por tanto, es lógico asumir que el daño al ADNmt puede ser el mecanismo responsable de los defectos específicos que se han encontrado en los complejos CI, CIII y CIV. El ADNmt es particularmente vulnerable al daño oxidativo, con un promedio de mutación 10 veces mayor que el producido en el genoma muscular²⁸.

También debemos tener en cuenta que es lógico que se dañen primero los complejos de transporte referidos, por ser el foco productor de RLO con altísima capacidad oxidante capaz de provocar daño oxidativo inmediato, así como por la falta de histonas protectoras y la limitada capacidad de reparación genética^{26,27}.

Esta hipótesis ha cobrado gran fuerza desde los trabajos de Bhat et al²⁹, quienes han demostrado una cantidad importante de daño del ADNmt, mediado por el sustrato específico de la delección 4977-bp del ADNmt, 17 veces mayor respecto al grupo control. Estos hallazgos sugieren que las especies oxidantes (RLO) producen dentro de la mitocondria daño (estrés) oxidativo al ADNmt de los pacientes con EAP, así como a los componentes proteicos y lipídicos de la célula y sus membranas, al no ser neutralizados por la SODMn.

Este daño oxidativo al ADNmt completaría el círculo vicioso al codificarse de forma defectuosa los complejos CI, CIII y CIV, lo que llevaría a su disfunción y al incremento sostenido en la producción de RLO, que al no poder ser neutralizados adecuadamente cerrarían el círculo del aumento de la disfunción mitocondrial a través de un estrés oxidativo permanente, que se pone en marcha cada vez que se activa la necesidad de producción de energía para la actividad muscular, como es el caso de los pacientes con EAP, dando paso al

fenómeno de la claudicación intermitente y a su interrelación con el fenómeno de isquemia-reperfusión^{30,31}.

Conclusiones

Las manifestaciones clínicas de la EAP parecen ser consecuencia, por una parte, del déficit de aporte sanguíneo a la extremidad isquémica por la enfermedad esteno-obstructiva arterial, y por otra, debido al resultado de la mitocondriopatía isquémica que se manifiesta en forma de disfunción mitocondrial en los músculos isquémicos afectados.

La mitocondriopatía podemos caracterizarla siguiendo la secuencia de acontecimientos en su seno: defecto de la CTE por afectación primaria de los complejos CI, CIII y CIV. Estos defectos dan como resultado una disminución del rendimiento bioenergético caracterizado por la inadecuada fosforilación oxidativa y el decrecimiento de la producción energética de ATP, lo que sumado al escaso flujo sanguíneo que llega al músculo isquémico, induce claudicación, menor rendimiento de la fuerza muscular y, en los casos más avanzados, isquemia crítica del miembro.

Con las cauciones necesarias al no estar todavía suficientemente aclarado el papel de las defensas antioxidantes, la mitocondriopatía sería perpetuada entonces por un círculo vicioso compuesto por los "insultos" cotidianos cada vez que el paciente camina por el fenómeno isquemia-reperfusión y la continua disfunción mitocondrial. El daño en la CTE aumentaría de forma exagerada la producción de RLO, que no podrían ser neutralizados, produciéndose daño oxidativo en el ADNmt, lo que perpetúa el círculo al codificarse posteriormente las nuevas mitocondrias, siempre de forma errónea.

Se precisa una evaluación más profunda de los fallos mitocondriales que causan disfunción y su relación con el rendimiento energético y con el fenómeno isquemia-reperfusión. Las posibles futuras líneas de investigación deberán aclararnos la relación de la intensidad de producción de RLO, el papel de los antioxidantes y su relación con el estrés oxidativo, además de conocer mucho más sobre la replicación mitocondrial errónea por posible daño en su genoma, pues es clave saber con certeza si el posible daño mitocondrial producido por la isquemia es transitorio o parcialmente permanente.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Criqui MH, Fronek A, Barret-Connor E, Klauber MR, Gabriel S, Goodman D. The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population. *Circulation*. 1985;71:510-51.
2. Hiatt WR, Hoag S, Hamman RF. Effect of diagnostic criteria on the prevalence of peripheral arterial disease. The San Luis Valley Diabetes Study. *Circulation*. 1995;91:1472-9.
3. Selvin E, Erlinger TP. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health Nutrition Examination Survey. 1999-2000. *Circulation*. 2004;110:738-43.

4. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). Section A: Epidemiology (S6-S14). *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007;33 Suppl 1:S1-75.
5. Makris KI, Nella AA, Zhu Z, Swanson SA, Casale GP, Gutti TL, et al. Mitochondriopathy of peripheral arterial disease. *Vascular.* 2007;15:336-43.
6. Pipinos II, Judge AR, Selsby JT, Zhu Z, Swanson SA, Nella AA, et al. The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: Part 2. Oxidative stress, neuropathy, and shift in muscle fiber type. *Vasc Endovascular Surg.* 2008;42:101-12.
7. Hedberg B, Angquist KA, Sjöstrom M. Peripheral arterial insufficiency and the fine structure of the gastrocnemius muscle. *Int Angiol.* 1988;7:50-9.
8. Marbini A, Gemignani F, Scoditti U, Rusticheli P, Braglia MM, Govoni E. Abnormal muscle mitochondria in ischemic claudication. *Acta Neurol Belg.* 1986;86:304-10.
9. Gardner AW, Killewich LA. Lack of functional benefits following infrainguinal bypass in peripheral arterial occlusive disease patients. *Vasc Med.* 2001;6:9-14.
10. Pipinos II, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Boska MD. Phosphorus 31 nuclear magnetic resonance spectroscopy suggests a mitochondrial defect in claudicating skeletal muscle. *J Vasc Surg.* 2000;31:944-52.
11. McDermott MM, Guralnik JM, Albay M, Bandinelli S, Miniati B, Ferruci L. Impairments of muscles and nerves associated with peripheral arterial disease and their relationship with lower extremity functioning: the InCHIANTI Study. *J Am Geriatr Soc.* 2004;52:405-10.
12. Turton EP, Coughlin PA, Kester RC, Scott DJ. Exercise training reduces the acute response associated with claudication. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002;23:309-16.
13. Gardner AW, Skinner JS, Cantwell BW, Smith LK. Prediction of claudication pain from clinical measurements obtained at rest. *Med Sci Sports Exerc.* 1992;4:163-70.
14. Larsen OA, Lassen NA. Effect of daily muscular exercise in patients with intermittent claudication. *Lancet.* 1966;2:1093-6.
15. Hiatt WR, Nawaz D, Regensteiner JG, Hossack KF. The evaluation of exercise performance in patients with peripheral vascular disease. *J Cardiopulm Rehabil.* 1988;12:525-32.
16. Bauer TA, Brass EP, Hiatt WR. Impaired muscle oxygen use at onset of exercise in peripheral arterial disease. *J Vasc Surg.* 2004;40:488-93.
17. Argov Z, Bank WJ. Phosphorus magnetic resonance spectroscopy (31 P MRS) in neuromuscular disorders. *Ann Neurol.* 1991; 30:90-7.
18. Kemp GJ, Thompson CH, Taylor DJ, Hands LJ, Rajagopalan B, Radda GK. Quantitative analysis of defects of mitochondrial oxidation during recovery from exercise. *Biochem Soc Trans.* 1993;21:176S.
19. Zatina MA, Berkowitz HD, Gross JM, Maris JM. Chance B 31P nuclear magnetic resonance spectroscopy noninvasive biochemical analysis of the ischemic extremity. *J Vasc Surg.* 1986; 3:411-20.
20. Schunk K, Romanneehsen B, Rieker O, Düber C, Kersjes W, Schadmand-Fischer S, et al. Dynamic phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy in arterial occlusive disease effects of vascular therapy on spectroscopic results. *Invest Radiol.* 1988; 33:329-35.
21. Pipinos II, Sharov VG, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A, Todor A, et al. Abnormal mitochondrial respiration in skeletal muscle in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg.* 2003;38:827-32.
22. Pipinos II, Judge AR, Zhu Z, Selsby JT, Swanson SA, Johanning JM, et al. Mitochondrial defects and oxidative damage in patients with peripheral arterial disease. *Free Radic Biol Med.* 2006;41:262-9.
23. Pipinos II, Judge AR, Selsby JT, Zhu Z, Swanson SA, Nella AA, et al. The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: Part 1. Functional and histomorphological changes and evidence for mitochondrial dysfunction. *Vasc Endovascular Surg.* 2008;41: 481-9.
24. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005;120:483-95.
25. Jandric-Balen M, Bozikov V, Bistrovic D, Jandric I, Bozikov J, Romic Z, et al. Antioxidant enzymes activity in patients with peripheral vascular disease, with and without presence of diabetes mellitus. *Coll Antropol.* 2003;27:735-43.
26. Tzagoloff A, Myers AM. Genetics of mitochondrial biogenesis. *Annu Rev Biochem.* 1986;55:249-85.
27. Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:1175-212.
28. Miquel J. An integrated theory of aging as the result of mitochondrial-DNA mutation in differentiated cells. *Arch Gerontol Geriatr.* 1991;12:99-107.
29. Bhat HK, Hiatt WR, Hoppel CL, Brass EP. Skeletal muscle mitochondrial DNA injury in patients with unilateral peripheral arterial disease. *Circulation.* 1999;99:807-12.
30. Vaquero-Morillo F, Fernández-Morán MC, González-Fueyo MJ. El daño isquemia-reperfusión y el síndrome de revascularización. En: SEACV. Vol 1. Tratado de las Enfermedades Vasculares. Barcelona: Viguera Ed; 2006. p. 493-508.
31. Condorelli M, Brevetti G. Intermittent claudication: an historical perspective. *Eur Heart J Suppl.* 2002;4 Suppl B:B2-7.