MÁRCIO AUGUSTO CAMPOS RIBEIRO

**PARTICIPAÇÃO DA ENZIMA ALDEÍDO DESIDROGENASE 2 NA
PROGRESSÃO DA DOENÇA ARTERIAL PERIFÉRICA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Ciências Morfofuncionais do
Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências
Morfofuncionais.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar
Batista Ferreira.

Versão Original

São Paulo
2017

RESUMO

Ribeiro, MAC. Participação da enzima aldeído desidrogenase 2 na progressão da doença arterial periférica. [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

A doença arterial periférica (DAP) é uma síndrome degenerativa multifatorial que acomete principalmente idosos e tem como principais características a redução da qualidade de vida e o aumento da mortalidade cardiovascular. Dentre as limitações funcionais impostas pela doença, a mais evidente é a piora da capacidade locomotora decorrente da claudicação intermitente (períodos alternados de isquemia e reperfusão). Atualmente não existem tratamentos farmacológicos capazes de bloquear a progressão da DAP, caracterizada pela redução da capacidade oxidativa muscular, excessivo estresse oxidativo e consequente acúmulo de aldeídos reativos no leito afetado. Com base nisso, o presente trabalho visou caracterizar o papel da enzima aldeído desidrogenase 2 na progressão da DAP. Para isso caracterizamos o modelo animal de DAP, e verificamos que camundongos C57Bl/6 após a cirurgia de oclusão de fluxo apresentam redução da atividade catalítica da enzima ALDH2. Fato acompanhado por uma intolerância ao esforço físico, atrofia e prejuízo na contratilidade muscular, além de desarranjo sarcomérico e mitocondrial. Em modelo de cultura celular, a inativação da enzima ALDH2, após hipóxia e reoxigenação levou ao prejuízo na angiogênese e disfunção mitocondrial. Esse mesmo fenômeno foi observado nos animais DAP tratados com inibidor, que desenvolveram disfunção mitocondrial e pobre resposta à atividade física. Em modelo de genético de redução da atividade da enzima ALDH2, foi possível ver exacerbada disfunção muscular. Baseado nesses resultados, acreditamos que a enzima ALDH2 desempenha um importante papel na progressão da doença arterial periférica, sendo um possível alvo terapêutico.

Palavras-chave: Doença arterial periférica. ALDH2. Metabolismo mitocondrial. Músculo esquelético. Alda-1.

ABSTRACT

Ribeiro, MAC. Role of aldehyde dehydrogenase 2 during peripheral arterial disease progression. [Masters Thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Peripheral arterial disease (PAD) is a multifactorial disease that mainly affects elderly reducing quality of life and increasing cardiovascular mortality. Among the functional limitations imposed by the disease, the progressive worsening of locomotor capacity – arising from intermittent periods of ischemia and reperfusion, are related to reduced muscle oxidative capacity, excessive oxidative stress and consequent accumulation of reactive aldehydes in the affected leg. We recently demonstrated that lipid peroxidation induced-toxic aldehydes accumulation contributes to ischemic heart disease progression. Interestingly, oxidation of these aldehydes through aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) activation was sufficient to protect against heart failure. Based on that, this work characterized the role of ALDH2 during PAD progression. The PAD animal model presented decreased skeletal muscle ALDH2 enzyme activity associated with exercise intolerance, muscle atrophy, poor muscle contraction, skeletal muscle sarcomeric disruption and accumulation of oversized mitochondria. After ALDH2 inhibitor treatment, cell culture exposed to hypoxia/reoxygenation stress showed impaired angiogenesis and mitochondrial dysfunction. Similar results were observed in a PAD animal model, where PAD mice treated with ALDH2 inhibitor showed mitochondrial dysfunction, muscle atrophy and impaired running capacity. Moreover, transgenic ALDH2 knockin mice (which have reduced ALDH2 activity) submitted to PAD showed a smaller muscle contraction, compared to wild type PAD mice. Our data suggest ALDH2 as an important therapeutic target to develop new therapy strategies to counteract PAD progression.

Keywords: Peripheral arterial disease. ALDH2. Mitochondrial metabolism. Skeletal muscle. Alda-1.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença Arterial Periférica (DAP)

A Doença Arterial Periférica (DAP) caracteriza-se primariamente pela redução do aporte sanguíneo para os membros inferiores em decorrência da obstrução das artérias ilíaca, femoral ou poplítea por meio da deposição de placas de gordura (1, 2). A DAP é comumente dividida em 4 estágios, conforme descrito por Rene Fontaine, sendo eles: Estágio 1) pacientes assintomáticos; Estágio 2) pacientes com dores ao caminhar, sintoma conhecido como claudicação intermitente; Estágio 3) o passo seguinte à claudicação intermitente, onde os pacientes sentem dores mesmo em repouso; e Estágio 4) quando os pacientes apresentam úlceras e/ou gangrena (3). Atualmente essa síndrome multifatorial é considerada um importante problema de saúde pública, afetando ~12% dos adultos com mais de 40 anos (4) e ~25% da população com mais de 60 anos (5). O processo inicial do desenvolvimento da DAP está associado à presença de um ou mais fatores de risco cardiovascular como tabagismo, diabetes, hipertensão arterial, dislipidemia e sedentarismo (6). Ainda, pacientes portadores de DAP são mais suscetíveis ao aparecimento de doenças isquêmicas como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (7).

A redução parcial ou total do fluxo sanguíneo, em decorrência da formação de placas de ateroma que se projetam para a luz arterial, frequentemente leva a um fenômeno denominado claudicação intermitente (2, 8, 9). Considerado o principal sintoma clínico da patologia, a claudicação intermitente é definida por períodos alternados de isquemia e reperfusão no membro afetado causando formigamento, ardência ou câimbra ao caminhar. Durante o caminhar a demanda metabólica dos membros inferiores é aumentada; entretanto, por conta da redução da luz do vaso, a região afetada não recebe sangue suficiente para sustentar o exercício, resultando em hipóxia local, interrupção da atividade locomotora e dor (10). Cabe salientar que o agravamento desses sintomas se faz presente em 25% dos pacientes, e que pacientes com claudicação intermitente apresentam mortalidade 3,5 vezes maior que os assintomáticos (11). A diminuição na capacidade funcional contribui significativamente para a progressão da DAP em homens e mulheres (2), pois resulta na atrofia e consequente redução da força muscular (12, 13). Resultados encontrados em nosso projeto de pesquisa também mostram que camundongos apresentam as mesmas alterações morfofuncionais musculares observadas na

progressão da DAP em humanos (Etapa 1 do presente projeto), assegurando a eficácia do modelo de DAP adotado.

A insuficiência de oxigênio que ocorre em decorrência da redução do fluxo sanguíneo é a principal causa da manifestação de DAP, entretanto, a mitocôndria vem ganhando cada vez mais destaque, por conta do seu papel fundamental para a bioenergética do mioblasto, contribuindo para o agravamento da miopatia presente na doença.

1.2 Mitocôndria

Em 1857 Rudolph Albert Von Kölliker, anatomista e fisiologista suíço, descreveu um compartimento citoplasmático granular com membrana própria. Mais tarde esse compartimento seria nomeado como mitocôndria. Cada organela é formada por uma dupla camada membranar, que abriga a maquinaria necessária para que ocorram importantes processos como a beta-oxidação, o Ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa. Assim sendo, a mitocôndria é conhecida como a central bioenergética celular (14). Além disso, ocorrem no ambiente mitocondrial importantes reações metabólicas, como o ciclo da ornitina, ou ciclo da ureia (ocorre na mitocôndria e no citoplasma celular), o metabolismo lipídico e a síntese de aminoácidos, hormônios e outras biomoléculas relacionadas à sinalização intracelular (15). Ainda, as mitocôndrias possuem participação direta na regulação de processos como apoptose, diferenciação, crescimento e proliferação celular (16, 17).

1.2.1 Bioenergética mitocondrial

A síntese de ATP ocorre na matriz mitocondrial e se dá a partir do acoplamento da fosforilação oxidativa à cadeia de transporte de elétrons. Muitos passos se fazem necessários para a produção de substratos para a fosforilação oxidativa, a maior fonte de ATP. O processo tem início no citosol com a conversão de glicose em piruvato, durante a glicólise. Então, o piruvato é transportado, através da dupla membrana mitocondrial, para a matriz, onde é convertido em acetil CoA. Este por sua vez alimenta o ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs) que produz os carreadores de elétrons NADH e FADH₂ (responsáveis por doar elétrons para os complexos I e II da cadeia transportadora, respectivamente). Os elétrons dos complexos I (malato-NADH) e II (succinato-FADH₂) promovem a redução da

coenzima Q e após isso transferidos para o complexo III e posteriormente para o citocromo c, uma proteína na periferia da membrana. Este por sua vez irá reduzir o complexo IV (citocromo c oxidase) que transfere os elétrons para seuceptor final o O_2 . A passagem dos elétrons pelos complexos I, II e IV é acompanhada por uma liberação de prótons da matriz para o espaço intermembranar da mitocôndria, gerando um gradiente eletroquímico. O gradiente eletroquímico é utilizado na conversão de ADP (adenosina difosfato) + P_i (fosfato inorgânico) em ATP através do complexo V (ATP-sintase) (14).

Durante sua passagem pela cadeia respiratória elétrons provenientes dos complexos I e III podem extravasar para o espaço intermembranar mitocondrial e reagir com o O_2 , formando ânion superóxido (O_2^-). Através da ação da superóxido desmutase mitocondrial (MnSOD), que apresenta como cofator o manganês, o O_2^- é transformado em H_2O_2 . O H_2O_2 pode difundir pela membrana ou se acumular na mitocôndria. Na mitocôndria, ao utilizar os estoques de NAD(P)H como fonte de elétrons, o H_2O_2 pode ser transformado em H_2O e O_2 pela ação da catalase ou pela oxidação da glutathione peroxidase/tioredoxina peroxidase (18). Caso esse sistema não seja eficaz na remoção do H_2O_2 , pode ser gerado o radical hidroxila (OH) que é um dos mais reativos dentre as espécies reativas e gera danos em muitas moléculas biológicas (19).

A produção exacerbada e acúmulo das diversas espécies reativas de oxigênio pode inativar proteínas mitocondriais, ou contribuir para a oxidação de lipídeos e carboidratos, levando à disfunção mitocondrial (20). O acúmulo das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio tem sido consideradas essenciais na geração e propagação do dano celular que resulta no estabelecimento e agravamento das doenças cardiovasculares (21).

1.2.2 Mitocôndria na doença arterial periférica

Mitocôndrias disfuncionais são consideradas centrais para a miopatia apresentada por pacientes DAP, pelo fato de comprometer a principal fonte de energia e produção de espécies reativas de oxigênio. A miopatia, na DAP, é caracterizada por um aumento no número de mitocôndrias disfuncionais com prejuízos significativos nos complexos I, III e IV da cadeia de transporte de elétrons (22, 23). Pipinos e colaboradores identificaram, por meio de teste não invasivo de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, redução na capacidade oxidativa

muscular de pacientes DAP (22). Mais recentemente o mesmo grupo associou essa redução na capacidade oxidativa, a redução na produção de ATP e o aumento do estresse oxidativo à uma reduzida capacidade funcional, caracterizada pela claudicação intermitente, atrofia muscular e redução na capacidade de produção de força muscular (24, 25). Além disso, foram observadas redução na recuperação de fosfocreatina e ADP após a realização de exercício físico moderado em pacientes DAP, quando comparados à indivíduos controle (26, 27). Ainda, por meio de espectroscopia de infravermelho, foi observado que a dessaturação da hemoglobina é reduzida durante a atividade física em pacientes DAP, comparados com uma população controle (28, 29). Este padrão de redução da cinética metabólica no membro afetado é sugestivo de um cenário onde as mitocôndrias disfuncionais não geram ATP suficiente para suprir a demanda durante o exercício, forçando sua interrupção (30).

Os sucessivos estímulos de isquemia e reperfusão parecem exacerbar o estresse oxidativo por meio de um desequilíbrio entre a produção e a remoção de espécies reativas de oxigênio (31). De fato, recente trabalho identificou aumento de 62% na liberação de espécies reativas de oxigênio endoteliais associado a uma redução na capacidade antioxidante em pacientes com DAP (32). Uma vez acumuladas, as espécies reativas de oxigênio podem oxidar lipídios de membrana (peroxidação lipídica) e gerar aldeídos citotóxicos como o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE). Weiss e colaboradores (2013) identificaram um aumento de 40% nos subprodutos da peroxidação lipídica, associado a uma atrofia muscular (músculo gastrocnêmico) em pacientes portadores de DAP (33). Além disso, acúmulos de outros marcadores da peroxidação lipídica – como o malondialdeído (MDA), também já foram identificados na musculatura esquelética na DAP (34).

Sabendo que o acúmulo desses aldeídos citotóxicos pode prejudicar diretamente a função mitocondrial exacerbando o dano oxidativo (35), um melhor entendimento do metabolismo oxidativo e da ação dos subprodutos da peroxidação lipídica (4-HNE), bem como o desenvolvimento de novas terapias capazes de combater o acúmulo desses aldeídos tóxicos, poderá ser de grande valia para o tratamento da DAP.

1.3 Aldeído desidrogenase 2 (ALDH2)

As aldeídos desidrogenases (ALDHs) fazem parte de uma família de enzimas que catalisam a oxidação de aldeídos a seus ácidos correspondentes, não tóxicos, em uma reação irreversível. Já foram descritas dezenove isoformas das ALDHs, que estão expressas em diversos tecidos. A aldeído desidrogenase 2 (ALDH2), responsável pelo metabolismo de aldeídos produzidos a partir do metabolismo do etanol (acetaldeído), peroxidação lipídica (MDA) e poluição (ex. acroleína), está localizada na matriz mitocondrial. Esta enzima homo-tetramérica também metaboliza aldeídos alifáticos de cadeia curta e cadeia longa, sendo responsável pela conversão oxidativa do 4-HNE a aldeídos menos tóxicos (36, 37).

A localização mitocondrial da ALDH2 é de particular importância na remoção de aldeídos tóxicos, uma vez que a membrana interna da mitocôndria é rica em ácidos graxos insaturados, sendo, portanto, importante alvo para o ataque de radicais livres gerados através da cadeia transportadora de elétrons (38).

Recentemente demonstramos uma redução na atividade enzimática da ALDH2 com a progressão da doença isquêmica cardíaca, e que o prejuízo nessa enzima mitocondrial correlaciona-se inversamente com a função cardíaca em ratos submetidos à cirurgia de constrição da artéria coronária descendente anterior (39). De maneira similar e pela primeira vez, resultados do presente projeto de pesquisa também apontam para uma redução de ~45% na atividade da ALDH2 na musculatura esquelética de camundongos com DAP (após constrição da artéria femoral) (Figura 10), sugerindo a possível participação dessa enzima no desenvolvimento da patologia.

A ativação farmacológica da ALDH2, e consequente remoção de aldeídos citotóxicos, protege o coração contra danos agudos e crônicos desencadeados pelo processo de isquemia-reperfusão (40). No entanto, não existem dados na literatura que reportem o efeito da ativação dessa enzima na DAP.

Cabe ainda complementar que mutações no gene da ALDH2 estão associadas ao maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A troca de um ácido glutâmico por uma lisina na região 487 do gene que codifica a ALDH2 (ALDH2 E487K) resulta na redução de 50% (heterozigose) e 95% (homozigose) da sua atividade enzimática (41). Essa é a mutação mais frequente em humanos, acometendo 560 milhões de pessoas (em sua maioria de descendência asiática), o que representa 8% da população mundial (42). Entretanto, atualmente não se sabe

se indivíduos portadores da mutação ALDH2 E487K são mais suscetíveis ao desenvolvimento da DAP. Na tentativa de estudar o efeito da mutação ALDH2 E487K encontrada em humanos na DAP, utilizamos no presente projeto de pesquisa animais transgênicos que mimetizam essa troca no DNA. Dados preliminares do nosso laboratório demonstram uma redução de 50% na atividade da ALDH2 no fígado de camundongos transgênicos heterozigotos (*1/*2) – que possuem apenas uma cópia do gene mutado, alcançando 85% de prejuízo na função da enzima em animais transgênicos homozigotos (*2/*2) – que apresentam as duas cópias do gene mutadas (Figura 19). Esses dados confirmam o fenótipo encontrado em humanos e viabilizam a utilização desses animais no presente projeto.

Devido ao seu papel fundamental na remoção de aldeídos tóxicos produzidos em doenças de origem isquêmicas, recentemente a enzima ALDH2 foi associada à DAP. Inicialmente o acúmulo de 4-HNE encontrado na corrente sanguínea de pacientes com DAP sugeriu a participação da enzima ALDH2 na progressão da síndrome (23). Na sequência, estudo recente demonstrou que injeções intramusculares de células-tronco de medula óssea com alta expressão de ALDHs em pacientes em estágio avançado da DAP levaram à melhora do quadro clínico dessa população (40), reforçando o papel das ALDHs na isquemia periférica. Sabe-se ainda que a redução da atividade da ALDH2 está associada com a progressão de doenças neuro-degenerativas como o Parkinson e o Alzheimer; e metabólicas, como o Diabetes *melitus*.

Em conjunto com a literatura, e baseados em nossos dados, acreditamos que a redução na atividade da ALDH2, e o consequente acúmulo de aldeídos reativos, pode influenciar diretamente a progressão da DAP. Considerando que a modulação da atividade da ALDH2 já se mostra promissora para o tratamento da doença isquêmica cardíaca acreditamos que ela também será de grande valia no tratamento de doenças isquêmicas não-cardíacas, como a DAP.

2 CONCLUSÃO

Os animais submetidos à cirurgia de oclusão de fluxo, que mimetizam a doença arterial periférica, apresentam os principais sintomas notados nos humanos, durante a doença, tais como redução de fluxo sanguíneo periférico, aumento na sensação de dor, redução de mobilidade, disfunção e atrofia muscular. Ainda, notamos, a partir de microscopia eletrônica de transmissão, um desarranjo sarcomérico e acúmulo de mitocôndrias gigantes. Além disso, observamos que a atividade da enzima ALDH2 encontra-se reduzida na DAP, apesar do aumento de sua expressão.

Ao tratar os animais DAP com uma droga inibidora da ALDH2 (Aldi) reduzimos a atividade da enzima e aumentamos sua expressão, além de gerar acúmulo de 4-HNE, resultando em disfunção mitocondrial, prejuízo na angiogênese, agravamento no quadro de atrofia e redução na capacidade de responder positivamente ao exercício físico. De forma semelhante, ao utilizarmos animais com redução na atividade da enzima ALDH2, foi possível observar, de forma basal, aumento no número de fibras com tamanho reduzido, e após DAP o quadro de disfunção muscular se apresentou exacerbado nos animais transgênicos.

Baseado nisso, nossos resultados fornecem evidências de que a ALDH2 é uma importante enzima na progressão da doença arterial periférica, auxiliando na manutenção das células musculares. E apontam a enzima aldeído desidrogenase 2 como um promissor alvo terapêutico no tratamento da doença arterial periférica.

REFERÊNCIAS¹

1. Hirsch AT, Criqui MH, Treat-Jacobson D, Regensteiner JG, Creager MA, Olin JW, et al. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA*. 2001;286(11):1317-24.
2. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2007;33 Suppl 1:S1-75.
3. R F, M K, R K. Surgical treatment of peripheral circulation disorders. Germany: Helvetica chirurgica acta 1954. p. 499-533.
4. Criqui MH, Fronek A, Barrett-Connor E, Klauber MR, Gabriel S, Goodman D. The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population. *Circulation*. 1985;71(3):510-5.
5. Makdisse Mea. A risk score for predicting peripheral arterial disease in individuals 75 years or older. *Arq Bras Cardiol*. 2007;**88**(6):630-6.
6. Makdisse M, Pereira AaC, Brasil DeP, Borges JL, Machado-Coelho GL, Krieger JE, et al. Prevalence and risk factors associated with peripheral arterial disease in the Hearts of Brazil Project. *Arq Bras Cardiol*. 2008;91(6):370-82.
7. Golomb BA, Dang TT, Criqui MH. Peripheral arterial disease: morbidity and mortality implications. *Circulation*. 2006;114(7):688-99.
8. Munger MA, Hawkins DW. Atherothrombosis: epidemiology, pathophysiology, and prevention. *J Am Pharm Assoc* (2003). 2004;44(2 Suppl 1):S5-12; quiz S-3.
9. Brevetti G, Schiano V, Chiariello M. Endothelial dysfunction: a key to the pathophysiology and natural history of peripheral arterial disease? *Atherosclerosis*. 2008;197(1):1-11.
10. Garcia LA. Epidemiology and pathophysiology of lower extremity peripheral arterial disease. *J Endovasc Ther*. 2006;13 Suppl 2:II3-9.
11. Dormandy J, Heeck L, Vig S. The fate of patients with critical leg ischemia. *Semin Vasc Surg*. 1999;12(2):142-7.
12. McDermott MM, Tian L, Ferrucci L, Liu K, Guralnik JM, Liao Y, et al. Associations between lower extremity ischemia, upper and lower extremity strength, and functional impairment with peripheral arterial disease. *J Am Geriatr Soc*. 2008;56(4):724-9.

¹De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

13. Kuo HK, Yu YH. The relation of peripheral arterial disease to leg force, gait speed, and functional dependence among older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2008;63(4):384-90.
14. Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1966;41(3):445-502.
15. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287(4):C817-33.
16. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007;12(5):913-22.
17. Antico Arciuch VG, Elguero ME, Poderoso JJ, Carreras MC. Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16(10):1150-80.
18. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell.* 2012;48(2):158-67.
19. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(4):333-43.
20. Friguet B, Bulteau AL, Petropoulos I. Mitochondrial protein quality control: implications in ageing. *Biotechnol J.* 2008;3(6):757-64.
21. Palaniyandi SS, Qi X, Yogalingam G, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. Regulation of mitochondrial processes: a target for heart failure. *Drug Discov Today Dis Mech.* 2010;7(2):e95-e102.
22. 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(5):944-52.
23. Pipinos II, Swanson SA, Zhu Z, Nella AA, Weiss DJ, Gutti TL, et al. Chronically ischemic mouse skeletal muscle exhibits myopathy in association with mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;295(1):R290-6.
24. 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.* 2007;41(6):481-9.
25. 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(2):101-12.

26. Brass EP, Hiatt WR, Green S. Skeletal muscle metabolic changes in peripheral arterial disease contribute to exercise intolerance: a point-counterpoint discussion. *Vasc Med*. 2004;9(4):293-301.
27. 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(2):176S.
28. Bauer TA, Brass EP, Hiatt WR. Impaired muscle oxygen use at onset of exercise in peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*. 2004;40(3):488-93.
29. Bauer TA, Brass EP, Barstow TJ, Hiatt WR. Skeletal muscle StO₂ kinetics are slowed during low work rate calf exercise in peripheral arterial disease. *Eur J Appl Physiol*. 2007;100(2):143-51.
30. Ueta CB, Gomes KS, Ribeiro MA, Mochly-Rosen D, Ferreira JC. Disruption of mitochondrial quality control in peripheral artery disease: New therapeutic opportunities. *Pharmacol Res*. 2017;115:96-106.
31. Turrens JF, Beconi M, Barilla J, Chavez UB, McCord JM. Mitochondrial generation of oxygen radicals during reoxygenation of ischemic tissues. *Free Radic Res Commun*. 1991;12-13 Pt 2:681-9.
32. Gardner AW, Parker DE, Montgomery PS, Sosnowska D, Casanegra AI, Ungvari Z, et al. Greater endothelial apoptosis and oxidative stress in patients with peripheral artery disease. *Int J Vasc Med*. 2014;2014:160534.
33. Weiss DJ, Casale GP, Koutakis P, Nella AA, Swanson SA, Zhu Z, et al. Oxidative damage and myofiber degeneration in the gastrocnemius of patients with peripheral arterial disease. *J Transl Med*. 2013;11:230.
34. Belch JJ, Mackay IR, Hill A, Jennings P, McCollum P. Oxidative stress is present in atherosclerotic peripheral arterial disease and further increased by diabetes mellitus. *Int Angiol*. 1995;14(4):385-8.
35. 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(2):262-9.
36. Song BJ, Abdelmegeed MA, Yoo SH, Kim BJ, Jo SA, Jo I, et al. Post-translational modifications of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and biomedical implications. *J Proteomics*. 2011;74(12):2691-702.
37. Budas GR, Disatnik MH, Mochly-Rosen D. Aldehyde dehydrogenase 2 in cardiac protection: a new therapeutic target? *Trends Cardiovasc Med*. 2009;19(5):158-64.
38. Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev*. 2007;87(4):1175-213.

39. Gomes KM, Campos JC, Bechara LR, Queliconi B, Lima VM, Disatnik MH, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 activation in heart failure restores mitochondrial function and improves ventricular function and remodelling. *Cardiovasc Res*. 2014;103(4):498-508.
40. Perin EC, Silva G, Gahremanpour A, Canales J, Zheng Y, Cabreira-Hansen MG, et al. A randomized, controlled study of autologous therapy with bone marrow-derived aldehyde dehydrogenase bright cells in patients with critical limb ischemia. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2011;78(7):1060-7.
41. Zhang Y, Ren J. ALDH2 in alcoholic heart diseases: molecular mechanism and clinical implications. *Pharmacol Ther*. 2011;132(1):86-95.
42. Chen CH, Ferreira JC, Gross ER, Mochly-Rosen D. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol Rev*. 2014;94(1):1-34.
43. Creager MA. Medical management of peripheral arterial disease. *Cardiol Rev*. 2001;9(4):238-45.
44. Niiyama H, Huang NF, Rollins MD, Cooke JP. Murine model of hindlimb ischemia. *J Vis Exp*. 2009(23).
45. Basak K, Manjunatha M, Dutta PK. Review of laser speckle-based analysis in medical imaging. *Med Biol Eng Comput*. 2012;50(6):547-58.
46. Binzoni T, Humeau-Heurtier A, Abraham P, Mahe G. Blood perfusion values of laser speckle contrast imaging and laser Doppler flowmetry: is a direct comparison possible? *IEEE Trans Biomed Eng*. 2013;60(5):1259-65.
47. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 1994;53(1):55-63.
48. Dixon WJ. Staircase bioassay: the up-and-down method. *Neurosci Biobehav Rev*. 1991;15(1):47-50.
49. Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1980;20:441-62.
50. Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(8):760-5.
51. Ingalls CP, Warren GL, Zhang JZ, Hamilton SL, Armstrong RB. Dihydropyridine and ryanodine receptor binding after eccentric contractions in mouse skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*. 2004;96(5):1619-25.
52. Ryan TE, Schmidt CA, Alleman RJ, Tsang AM, Green TD, Neufer PD, et al. Mitochondrial therapy improves limb perfusion and myopathy following hindlimb ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;97:191-6.

53. Campos JC, Queliconi BB, Dourado PM, Cunha TF, Zambelli VO, Bechara LR, et al. Exercise training restores cardiac protein quality control in heart failure. *PLoS One*. 2012;7(12):e52764.
54. Fowkes FG, Rudan D RI, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, Norman PE, et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. 2013.
55. Hirsch AT, Hartman L, Town RJ, Virnig BA. National health care costs of peripheral arterial disease in the Medicare population. *Vasc Med*. 2008;13(3):209-15.
56. Chen CH, Sun L, Mochly-Rosen D. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases. *Cardiovasc Res*. 2010;88(1):51-7.
57. Wang B, Wang J, Zhou S, Tan S, He X, Yang Z, et al. The association of mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene (ALDH2) polymorphism with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease in Chinese. *J Neurol Sci*. 2008;268(1-2):172-5.
58. Seitz HK, Matsuzaki S, Yokoyama A, Homann N, Väkeväinen S, Wang XD. Alcohol and cancer. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001;25(5 Suppl ISBRA):137S-43S.
59. Hui P, Nakayama T, Morita A, Sato N, Hishiki M, Saito K, et al. Common single nucleotide polymorphisms in Japanese patients with essential hypertension: aldehyde dehydrogenase 2 gene as a risk factor independent of alcohol consumption. *Hypertens Res*. 2007;30(7):585-92.
60. Xu F, Chen Y, Lv R, Zhang H, Tian H, Bian Y, et al. ALDH2 genetic polymorphism and the risk of type II diabetes mellitus in CAD patients. *Hypertens Res*. 2010;33(1):49-55.
61. Gomes KM, Bechara LR, Lima VM, Ribeiro MA, Campos JC, Dourado PM, et al. Aldehydic load and aldehyde dehydrogenase 2 profile during the progression of post-myocardial infarction cardiomyopathy: benefits of Alda-1. *Int J Cardiol*. 2015;179:129-38.
62. McDermott MM, Ades P, Guralnik JM, Dyer A, Ferrucci L, Liu K, et al. Treadmill exercise and resistance training in patients with peripheral arterial disease with and without intermittent claudication: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2009;301(2):165-74.
63. Casanova C, Celli BR, Barria P, Casas A, Cote C, de Torres JP, et al. The 6-min walk distance in healthy subjects: reference standards from seven countries. *Eur Respir J*. 2011;37(1):150-6.
64. Solenski NJ, diPierro CG, Trimmer PA, Kwan AL, Helm GA, Helms GA. Ultrastructural changes of neuronal mitochondria after transient and permanent cerebral ischemia. *Stroke*. 2002;33(3):816-24.
65. Liu X, Sun X, Liao H, Dong Z, Zhao J, Zhu H, et al. Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase 2 Regulates Revascularization in Chronic Ischemia: Potential Impact

on the Development of Coronary Collateral Circulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(10):2196-206.

66. Pan G, Deshpande M, Thandavarayan RA, Palaniyandi SS. ALDH2 Inhibition Potentiates High Glucose Stress-Induced Injury in Cultured Cardiomyocytes. *J Diabetes Res.* 2016;2016:1390861.

67. Doser TA, Turdi S, Thomas DP, Epstein PN, Li SY, Ren J. Transgenic overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 rescues chronic alcohol intake-induced myocardial hypertrophy and contractile dysfunction. *Circulation.* 2009;119(14):1941-9.

68. Hamburg NM, Balady GJ. Exercise rehabilitation in peripheral artery disease: functional impact and mechanisms of benefits. *Circulation.* 2011;123(1):87-97.

69. Zhang Q, Zheng J, Qiu J, Wu X, Xu Y, Shen W, et al. ALDH2 restores exhaustive exercise-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;485(4):753-60.