FABIO MELO BESSA DE SOUZA

**O efeito do exercício aeróbico aquático na hemartrose
experimental induzida em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos
Inflamatórios e Alérgicos

Orientadora: Profa. Dra. Suzana
Beatriz Veríssimo de Mello

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Fabio Melo Bessa de

O efeito do exercício aeróbico aquático na hemartrose experimental induzida em
ratos / Fabio Melo Bessa de Souza. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos.

Orientadora: Suzana Beatriz Veríssimo de Mello.

Descritores: 1.Hemofilia A 2. Hemartrose 3.Exercício 4.Inflamação
5.Densidade óssea 6.Sinovite

USP/FM/DBD-278/16

Esse Estudo foi realizado com Auxílio Financeiro da Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Projeto 2012/18588-1.

Aos meus pais, Jadir Bessa e Elisabete Bessa, que sempre me apoiaram em todas as etapas de estudo as que percorri até aqui. Do Ensino Básico até o Doutorado, sempre estiveram do meu lado e não mediram esforços para me dar uma boa educação.

À minha esposa Tatiane Bessa, que vivenciou os bastidores deste projeto durante 4 anos sempre do meu lado com seu apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profa. Dra. Suzana Beatriz Veríssimo de Mello**, que foi **A** regente deste projeto. Abriu todas as portas necessárias para que ele fosse executado e sempre se mostrou disposta a me ajudar nessa longa jornada.

À **Profa. Dra. Clarice Tanaka**, que, literalmente, me levou pelas mãos até a Pós-Graduação para apresentar o primeiro rascunho deste projeto. Toda a minha bagagem acadêmica necessária para iniciar a etapa de Doutorado foi construída por meio das experiências didáticas e em pesquisa que me ofereceu. Considero-a como minha “madrinha” dentro da Universidade de São Paulo.

À **Aurora e Fátima**, envolvidas em praticamente todas as etapas críticas do projeto. Extremamente profissionais e solícitas, não hesitaram em oferecer ajuda, e foram meu braço direito e esquerdo nessa jornada.

À **Dra. Rosa Maria R. Pereira e Liliam Takayama** do Laboratório de Metabolismo Ósseo (LIM-17) da Disciplina de Reumatologia da FMUSP, pela parceria e paciência na análise da densidade mineral óssea.

À **Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira**, e a seus alunos **Tiago Fernandes e Fernanda Roberta Roque** do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Escola de Educação Física e Esporte da USP, por disponibilizar seu espaço físico para a execução do protocolo de exercício aeróbico

À **Dra. Yara Curi, Dra. Gisela Picolo e Leandro Grecco** do Laboratório de Dor e Sinalização do Instituto Butantan, por me receber no laboratório e nos ajudar na avaliação da dor.

Aos Funcionários dos Biotérios que passei, pela manutenção de nossos animais. Em especial, ao **Antônio** da Reumatologia e ao **Ney** da EEFE, que foram muito além do cuidado com os animais, me ajudando em etapas fundamentais deste projeto.

A todas as Secretárias da Disciplina de Reumatologia e da Pós-Graduação.

À **Profa. Dra. Eloisa Bonfá** e a todos os integrantes da Comissão de Pós-Graduação da Reumatologia que acreditaram e apoiaram a realização de meu projeto em seu Departamento.

A **TODOS** os amigos e colegas do Serviço de Fisioterapia do ICHC que me ajudaram a crescer como profissional.

Ao Serviço de Hemofilia do Hospital das Clínicas, em especial, ao **Dr. Jorge Carneiro e Dra. Paula Villaça**, pela oportunidade de participar de estudos importantes com pacientes hemofílicos, e, assim, ter uma noção deste universo e poder contribuir de alguma forma nesta área.

À **FAPESP**, por todo o auxílio financeiro disponibilizado para que esse projeto se concretizasse. E à **CAPES**, pela bolsa concedida.

*“Imagination is more important than knowledge.
For knowledge is limited, whereas imagination embraces the
entire world, stimulating progress, giving birth to evolution. It is,
strictly speaking, a real factor in scientific research”.*

Albert Einstein
(Laureado com o Prêmio Nobel de Física de 1921)

NORMALIZAÇÃO ADOPTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Introdução à hemofilia.....	2
1.2 Fisiopatologia da artropatia hemofílica	3
1.3 Hemofilia e alterações ósseas	6
1.4 Exercício e hemofilia	7
1.5 Modulação da inflamação pelo exercício.....	8
1.6 Justificativa e hipótese do estudo	10
2 OBJETIVOS	13
3 MÉTODOS.....	15
3.1 Animais	15
3.2 Protocolo experimental de hemartrose de repetição	15
3.3 Protocolo de exercício aeróbico aquático	16
3.4 Marcadores de treinamento físico.....	18
3.5 Avaliação da dor	18
3.6 Mensuração do diâmetro articular	19
3.7 Coleta do líquido sinovial.....	19
3.8 Avaliação da densidade mineral óssea	20
3.9 Eutanásia	21
3.10 Ensaio multiplex para detecção da concentração de citocinas	21
3.11 Protocolo de ELISA para marcadores do metabolismo ósseo e hormônios	21
3.12 Análise estatística.....	22
4 RESULTADOS	24
4.1 Evolução ponderal.....	24
4.2 Marcadores do treinamento físico.....	24

4.3 Diâmetro articular	25
4.4 Avaliação da dor	26
4.5 Avaliação do líquido sinovial	28
4.5.1 Produção de citocinas.....	28
4.5.2 MCP-1	29
4.5.3 VEGF	30
4.6 Avaliação das citocinas plasmáticas	32
4.6.1 MCP-1	34
4.6.2 VEGF	34
4.6.3 Hormônios.....	35
4.7 Avaliação óssea	35
4.7.1 Densidade mineral óssea (DMO).....	35
4.7.2 Marcadores do metabolismo ósseo	37
5 DISCUSSÃO.....	40
6 CONCLUSÃO	47
7 ANEXOS.....	49
7.1 ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética.....	49
7.2 ANEXO B - Carta de premiação do trabalho em um Congresso Internacional da Federação Mundial de Hemofilia 2016, Orlando, Flórida, EUA, como um dos 10 melhores na categoria <i>Young Research</i>.....	50
8 REFERÊNCIAS	52

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<	Menor
=	Igual
>	Maior
AH	Artropatia Hemofílica
ANOVA	Análises de Variância Simples
b-ALP	<i>Bone Alkaline Phosphatase</i>
B-ALP	Fosfatase Alcalina Específica do Osso
bpm	Batimentos por Minutos
CEUA	Comitê de Ética para Uso de Animais
COMP	Proteína Oligomérica da Matriz da Cartilagem
CTx	<i>Collagen Type 1 Cross-Linked C-Telopeptide</i>
CTX	<i>C-Terminal Telopeptide</i>
DMO	Densidade Mineral Óssea
DP	Desvio Padrão
DXA	Densitometria de Dupla Emissão de Fonte de Raios-X
EEFE	Escola de Educação Física e Esportes
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FCR	Frequência Cardíaca de Repouso
Fe ⁺	Fenton
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
gr	Gramma
H	Hemartrose
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HE	Hemartrose + Exercício
Kg	Kilo
LIM-17	Laboratório de Metabolismo Ósseo
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>

mg	Miligrama
mm	Milímetros
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
NTx	N-telopeptide
OA	Osteoartrose
OC	Osteocalcina
OH-	Radicais Hidroxilas
P1NP	<i>Total Procollagen Type 1 N-Terminal Propeptide</i>
pg/mL	Picograma por Litro
S	Solução Salina
TRAP-5b	<i>Tartrate-Resistant Acid Phosphatase</i>
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vs.	versus
μl	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vista superior do tanque adaptado.	17
Figura 2	Carga de 5% do peso corporal fixada na cauda.	17
Figura 3	<i>Columbus Incapacitance Tester Version 5</i>	19
Figura 4	Densitômetro <i>Hologic Discovery A</i> (Bedford, Massachusetts, EUA).	20
Figura 5	Evolução ponderal dos animais do Grupo Controle (n=8), Grupo Hemartrose (n=8) e Grupo Hemartrose + Exercício (n=10).	24
Figura 6	Diâmetro articular dos joelhos (salina e hemartrose) dos animais dos Grupos C (Controle, n=8), H (Hemartrose, n=8) e HE (Hemartrose + Exercício n=10) após 8 semanas de treinamento aquático.	25
Figura 7	Variação do diâmetro articular (Δ = diâmetro do joelho hemartrose – joelho salina) nos animais do Grupo C (n=8), H (n=8) e HE (n=10) ao término do protocolo de exercício aquático.	26
Figura 8	Cinética da dor nas articulações com hemartrose dos Grupos Controle (n=8), Hemartrose (n=8) e Hemartrose + Exercício (n=10) durante 8 semanas do protocolo de exercício aquático.	27
Figura 9	Concentração Média (+DP) no Lavado do Líquido Sinovial da Citocina IL-4 nos Grupos Controle (C), Hemartrose (H) e Hemartrose Exercício (HE).	28
Figura 10	Concentração Média (+DP) no Lavado do Líquido Sinovial da Citocina IL-10 nos Grupos Controle (C), Hemartrose (H) e Hemartrose Exercício (HE)	29
Figura 11	Concentração Média (+DP) de MCP-1 obtida no lavado do líquido sinovial nos Grupos Controle (C), Hemartrose (H) e Hemartrose Exercício (HE)	30
Figura 12	Concentração Média (+DP) de VEGF obtida no lavado do líquido sinovial nos Grupos Controle (C), Hemartrose (H) e Hemartrose Exercício (HE)	31

Figura 13	Concentração Média (+DP) Plasmática da Citocina IL-4 nos Grupos Controle (C), Hemartrose (H) e Hemartrose Exercício (HE).....	33
Figura 14	Concentração Média (+DP) Plasmática da Citocina TNF- α nos Grupos Controle (C), Hemartrose (H) e Hemartrose Exercício (HE).....	33
Figura 15	Concentração Média (+DP) Plasmática de MCP-1 nos Grupos Controle (C), Hemartrose (H) e Hemartrose Exercício (HE).....	34
Figura 16	Concentração plasmática de Melatonina nos Grupos Controle (C), Hemartrose (H) e Hemartrose Exercício (HE)	35
Figura 17	Densidade mineral óssea antes e após o protocolo de 8-semanas de exercício aquático no fêmur (painel A), tíbia (painel B) e articulação do joelho (painel C) no membro com hemartrose dos Grupos H e HE. Grupo C (n=8), H (n=8) e HE (n=10).....	36
Figura 18	Concentração plasmática de P1NP nos Grupos-Controle (C; n=8), Hemartrose (H; n=8) e Hemartrose + Exercício (HE; n=10)	37
Figura 19	Concentração plasmática de CTX nos Grupos-controle (C; n=8), Hemartrose (H; n=8) e Hemartrose + Exercício (HE; n=10)	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração de VEGF encontrada no lavado sinovial.	31
Tabela 2	Concentração plasmática das citocinas.....	32

RESUMO

Souza FMB. *O efeito do exercício aeróbico aquático na hemartrose experimental induzida em ratos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2016.

INTRODUÇÃO: A prática de exercício físico e esporte tem sido recomendada para pacientes com hemofilia com o intuito de melhorar a qualidade de vida e reduzir a morbidade ocasionada por episódios recorrentes de sangramento no sistema musculoesquelético. A natação e os exercícios aquáticos são amplamente indicados para essa população por ocasionar uma menor sobrecarga articular e um menor risco de sangramento. Porém, ainda não se sabem os efeitos que o exercício aeróbico aquático pode ocasionar na inflamação articular e densidade mineral óssea após episódios de hemartrose de repetição. **MÉTODOS:** 26 ratos wistar foram divididos em Grupo-controle (C; n=8), Grupo Hemartrose (H; n=8) e Hemartrose Exercício (HE; n=10). A hemartrose foi induzida na articulação do joelho direito semanalmente por 8 semanas no Grupo H e HE por meio de infusão de sangue autólogo (0.1ml). O Grupo HE realizou um protocolo de exercício aeróbico aquático com um peso de 5% do peso corporal fixado na cauda com sessões diárias de 1 hora, 5x por semana por 8 semanas. A densidade mineral óssea (DMO) foi avaliada pré e pós-protocolo nas seguintes regiões: corpo total, fêmur, tibia e articulação do joelho. Ao final do experimento, o plasma e o lavado do líquido sinovial foram avaliados para as concentrações das seguintes citocinas: interleucina (IL)-1 α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interferon γ (IFN- γ). A concentração plasmática dos hormônios: adrenocoticotrófico (ACTH), corticosterona e melatonina, e os marcadores plasmáticos do metabolismo ósseo pró-peptídeo aminoterminal do pró-colágeno tipo I (P1NP) e telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX) foram avaliados também no final do estudo. **RESULTADOS:** O protocolo de exercício reduziu os níveis de MCP-1 (p=0,036) e VEGF (p=0,014), e aumentou os níveis de IL-4 (p<0,02) e IL-10 (p<0,01) no líquido sinovial em relação ao Grupo H. A análise plasmática mostrou um aumento da concentração de IL-4 (p=0,002) e melatonina (p=0,04), e uma redução de MCP-1 (p=0,02) e TNF- α (p=0,04) no Grupo HE quando comparado com o H. O grupo H mostrou uma redução da DMO no fêmur, tibia e articulação do

joelho quando comparado com os Grupos C e HE ($p < 0,0001$ para todas as comparações vs. C e HE). O nível de P1NP foi maior no Grupo HE do que no H ($p = 0,002$) e de CTX menor no Grupo H quando comparado com o HE ($p = 0,001$). **CONCLUSÕES:** Em conjunto, nossos resultados sugerem a capacidade do exercício aeróbico aquático em reduzir a inflamação articular, dor e prevenir a perda óssea local em modelo experimental de hemartrose.

Descritores: hemofilia A; hemartrose; exercício; inflamação; densidade óssea; sinovite.

ABSTRACT

Souza FMB. *The effects of aquatic aerobic exercise on experimental-induced hemarthrosis in rats* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

INTRODUCTION: Physical exercise and sports has been recommended for patients with hemophilia with the aim to improve the quality of life and co-morbid related to repetitive episodes of bleeds into musculoskeletal system. Swimming and aquatic exercises has been widely indicated for this population given the fact that it promote less joint overload and a decreased risk of bleeding. However, we still don't know how the aquatic aerobic exercise can influence the joint inflammation and bone mineral density after repetitive episodes of hemarthrosis. **METHODS:** 26 male rats wistar were divided in Control Group (C; n=8), hemarthrosis Group (H; n=8) and hemarthrosis exercise Grup (HE; n=10). hemarthrosis was weekly induced via autologous blood injections (0.1 mL) over 8 weeks. The HE Group was subjected to a swimming exercise protocol that included a weight attached to the tail (5% of body weight), and it was performed in 1-hour sessions 5 times a week for 8 weeks. The bone mass density (BMD) was evaluated at the femur, tibia, knee joint regions and total body at baseline and after the haemarthrosis protocol. At end of exercise protocol plasma and synovial fluid concentration of interleukin (IL)-1 α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor α (TNF- α) and interferon γ (IFN- γ). Hormone plasmatic concetration were assesed for adrenocorticotrophic (ACTH), corticosterone and melatonin and bone turnover markers Procollagen Type 1 N-Terminal Propeptide (P1NP) and collagen type 1 cross-linked C-telopeptide (CTX) were also assessed at the end of the study. **RESULTS:** A decrease in concentration of MCP-1 (p=0,036) and VEGF (p=0,014) as well as a increase in IL-4 (p<0,02) and IL-10 (p<0,01) levels were observed at HE group when compared to H group. Plasmatic analysis showed a increase in IL-4 (p=0,002) and melatonin (p=0,04) and a reduction in MCP-1 (p=0,02) and TNF- α (p=0,04) in HE Group in relation to H group. The H Group showed significantly reduced gains in BMD at the femur, tibia and knee joint compared with that of the HE Group (p<0.0001 for all comparisons vs. the H). The P1NP concentrations were higher in the HE Group than in the H (p=0.002), and the CTX levels were lower in the HE Group than in the H

($p=0.001$). **CONCLUSIONS:** Taken together, our results suggests that aquatic aerobic exercise has the capacity to reduce the joint inflammation, pain and prevent bone loss in an experimental-induced hemarthrosis model.

Descriptors: hemophilia A; hemarthrosis; exercise; inflammation; bone density; synovitis.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Introdução à hemofilia

A Hemofilia é uma desordem do processo de coagulação resultante da deficiência congênita ou ausência do fator VIII no tipo A e do fator IX no tipo B (Mannucci, Tuddenham, 1999). A Hemofilia A e B são, clinicamente, similares e são distinguidas apenas pelos níveis de atividade dos fatores VIII e IX. A prevalência mundial estimada, é de 1 para 10.000 na hemofilia A e 1 para 25.000 para hemofilia B, sendo o número de afetados no mundo de, aproximadamente, 400.000 indivíduos (Stonebraker *et al.*, 2010). A Hemofilia é uma doença genética recessiva ligada ao cromossomo X e, portanto, apenas os homens são afetados (Srivastava *et al.*, 2013). A frequência e a gravidade de suas complicações estão relacionadas ao percentual do fator deficitário, que a classifica em leve (6 a 40%), moderada (2 a 5%) e grave (<1%) (Dunn, 2011).

A maioria dos eventos hemorrágicos nos pacientes com hemofilia ocorre nas articulações sendo denominada hemartroses e, nos pacientes com o tipo severo da doença, pode atingir entre 20 a 40 episódios por ano (Ljung *et al.*, 1990). A morbidade destas hemorragias intra-articulares é significativa: aos 25 anos de idade, aproximadamente, 90% das pessoas com hemofilia severa terão alterações crônicas degenerativas em uma a seis articulações (Aledort *et al.* 1994). Na Hemofilia severa, 92% de todos os episódios de sangramentos ocorrem nas articulações, sendo 80% delas nos tornozelos, joelhos e cotovelos. Os sangramentos recorrentes causam danos nos componentes articulares levando a uma condição conhecida como artropatia hemofílica (AH) considerada a mais importante causa de morbidade nos pacientes hemofílicos (Madhok *et al.*, 1991). A AH é caracterizada por alterações degenerativas e inflamatórias na membrana sinovial, cartilagem articular e osso subcondral. O tratamento baseado na

reposição profilática (profilaxia primária) do fator de coagulação deficitário tem como objetivo prevenir e interromper o círculo vicioso da hemartrose/degeneração articular (Pettersson *et al.*, 1981; Lofqvist *et al.*, 1997). Os regimes de profilaxia primária empregados em crianças elevaram a qualidade de vida e a saúde musculoesquelética dos pacientes com hemofilia (Blanchette *et al.*, 2004; Manco-Johnson *et al.*, 2007), entretanto, segundo a Federação Mundial de Hemofilia (*World Federation of Haemophilia Website*), aproximadamente, 75% dos pacientes hemofílicos no mundo não têm acesso a este regime terapêutico considerado ideal e recebem a profilaxia secundária (períodos/eventos específicos) ou “em demanda” após a ocorrência do sangramento (Pergantou *et al.*, 2010).

1.2 Fisiopatologia da artropatia hemofílica

Os sangramentos articulares recorrentes podem levar a uma artropatia severa (Arnold, Hilgartner, 1977; Stein, Duthie, 1981; Rodriguez-Merchan, 1996; Gilbert, 2000; Luck *et al.*, 2004; Hoots, 2006;). Este processo entre o sangramento e o estabelecimento da artropatia é multifatorial, e envolve alterações no tecido sinovial, cartilagem e osso subcondral. Uma das funções da membrana sinovial é remover o excesso de líquidos e partículas na cavidade articular, e isto inclui o sangue na hemartrose (Iwanaga, *et al.*, 2000). Este processo de remoção do sangue, normalmente em grandes quantidades, desencadeia uma reação inflamatória do tecido sinovial, que resulta em hipertrofia e hiperplasia dos sinoviócitos (Roy, Ghadially, 1969) e angiogênese (Madhok, 1991) da camada subíntima, o que, por sua vez, aumenta o risco de sangramentos subsequentes. Essa sinovite progressiva (Mainardi *et al.*, 1978; Rodriguez-Merchan, 1997; Valentino *et al.*; Rodriguez-Merchan, 2007) culmina em um processo fibrótico (Stein, Duthie, 1981; Madhok *et al.*, 1991). O produto gerado pela degradação da hemoglobina, a hemossiderina, se acumula no tecido sinovial retroalimentando a resposta

inflamatória articular e pode ser observado, também, na cartilagem (Hough *et al.*, 1976; Stein, Duthie, 1981).

Há evidências de que o ferro, derivado dos eritrócitos, tenha um papel importante nas alterações sinoviais que ocorrem na hemartrose. O ferro acumulado no tecido sinovial (Morris *et al.*, 1984; Morris *et al.*, 1986; Roosendaal *et al.*, 1998a; Roosendaal *et al.* 1998b;) estimula a proliferação dos sinoviócitos (Nishiya, 1994). Além disto, a expressão do *proto-oncogene c-myc* (Wen *et al.*, 2002) assim como a proteína mdm2 (Hakobyan *et al.*, 2004) são aumentadas na presença do ferro, e ambas podem estar envolvidas na hipertrofia do tecido sinovial por interferirem na proliferação celular e apoptose. O tecido sinovial, na presença de hemossiderina, apresenta uma produção aumentada de citocinas inflamatórias, como a interleucina IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Roosendaal *et al.*, 1998a), além da secreção de enzimas que degradam a matriz extracelular (Cawston, Wilson, 2006; Rengel *et al.*, 2007).

A inflamação da articulação tem sido apontada como um fator central na artropatia hemofílica (Srivastava, 2015). Foi demonstrado em camundongos knockout FVIII que, durante a hemartrose, a ativação das vias do NF- κ B (fator nuclear kappa B) é fundamental no desenvolvimento da artropatia hemofílica (Sem *et al.*, 2013). O estudo de Ovlsen *et al.* (2009) mostrou um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6) e do MCP-1 líquido sinovial que poderiam contribuir para a manutenção do processo inflamatório e recrutamento de monócitos para a cavidade articular. Recentemente, foi demonstrado que a IL-1 β é necessária para a destruição da cartilagem induzida por sangue e seu bloqueio praticamente anula os efeitos deletérios sobre a articulação (van Vulpen *et al.*, 2015). Em função do papel crucial da inflamação na artropatia hemofílica, foi sugerido que bloquear os efeitos deletérios das citocinas após um episódio de hemartrose poderia limitar de maneira significativa a lesão articular em pacientes com hemofilia (Srivastava, 2015).

A cartilagem, entretanto, não é afetada apenas pelo processo inflamatório, o sangue *per se* tem capacidade de produzir efeitos lesivos na cartilagem independentemente da reação sinovial (Roosendaal *et al.*, 1997; Roosendaal *et al.*, 1999; Hooiveld *et al.*, 2003; Hooiveld *et al.*, 2003a; Hooiveld *et al.*, 2003b). A adição de sangue à cartilagem articular *in vitro* durante 4 dias resulta em inibição da taxa de síntese dos proteoglicanos e em aumento da quebra dos proteoglicanos da matriz cartilaginosa (Roosendaal *et al.* 1997; Roosendaal *et al.*, 1999). A inibição da síntese dos proteoglicanos persiste, no mínimo, por 10 semanas após a exposição inicial de sangue total por 4 dias, e a combinação dos eritrócitos e células mononucleares parece ser responsável por este efeito (Roosendaal *et al.*, 1997; Roosendaal *et al.*, 2000). O efeito prolongado na inibição da síntese de proteoglicanos pode ser consequência da apoptose dos condrócitos (Roosendaal *et al.*, 1999; Hooiveld *et al.*, 2003). Os condrócitos são as células responsáveis pela produção e manutenção da cartilagem articular, considerando que, em adultos, estas células dificilmente se proliferam, a perda dos condrócitos ocasiona um efeito altamente deletério para a matriz cartilaginosa (Burkhardt *et al.*, 1986). A apoptose dos condrócitos é resultado do estresse oxidativo resultante da interação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com o ferro derivado das células vermelhas. Esta interação entre H_2O_2 e Fe^{+} , pela reação de Fenton, acarreta a produção de radicais hidroxilas ($OH\cdot$), altamente lesivos (Tiku *et al.*, 1990; Winterbourn; Morris *et al.*, 1995; Henle, Linn, 1997; Roosendaal *et al.*, 1999; Hooiveld *et al.*, 2003).

Estudos *in vivo* corroboram os efeitos descritos *in vitro* (Roosendaal *et al.*, 1999; Roosendaal *et al.*, 2000; Rengel *et al.*, 2007). Injeções de sangue no joelho de cães resultaram em diminuição na taxa de síntese e aumento na liberação dos proteoglicanos. Adicionalmente, a cartilagem de animais mais jovens parece ser mais afetada do que a de animais maduros (Hooiveld *et al.*, 2003). Quando associado a cargas compressivas, as mudanças degenerativas foram mais evidentes (Hooiveld *et al.*, 2004) e, em função deste estudo, a Federação Mundial de Hemofilia recomenda uma

restrição temporária na descarga de peso sobre a articulação afetada pelo sangramento (Srivastava *et al.*, 2013).

1.3 Hemofilia e alterações ósseas

As hemartroses de repetição impactam também de forma negativa sobre o tecido ósseo (Pettersson *et al.*, 1980; Pergantou *et al.*, 2010). Alterações subcondrais são observadas depois de sangramentos repetitivos, como a formação de cisto subcondral, erosão e formação de osteófitos (Utukuri & Goddard, 2005). Recentemente, um grande número de estudos tem mostrado uma redução na Densidade Mineral Óssea (DMO) em crianças e adultos com hemofilia (Gallacher *et al.*, 1994; Barnes *et al.*, 2004; Wallny *et al.*, 2007; Mansouritorghabeh *et al.*, 2008). Os fatores de risco associado com as alterações ósseas nessa população vão desde redução nos níveis de atividade física durante a infância (Tlacuilo-Parra *et al.*, 2008) e níveis piores de alteração articular em função de sangramentos repetitivos (Wallny *et al.*, 2007; Gerstner *et al.*, 2009), assim como infecções virais como a hepatite C e HIV (Gerstner *et al.*, 2009). Uma associação direta entre a deficiência do FVIII de coagulação e problemas estruturais ósseos foi sugerida por Liel *et al.* (2015) por meio de um estudo no qual foi demonstrado que camundongos knockout-FVIII possuem uma menor densidade mineral e resistência óssea quando comparado a um modelo animal selvagem independentemente de sangramentos articulares ou infecções virais.

Apesar de valores baixos de DMO estarem associados a taxas de fratura maior, apenas recentemente o estudo de coorte feito por Gay *et al.* (2015) demonstrou uma maior incidência de fraturas em indivíduos com hemofilia quando comparado com saudáveis (24,8 vs. 9,6 fraturas por 1000 pacientes-ano, respectivamente). Também foi demonstrado que pacientes com hemofilia severa tem 44% mais chances de ter fraturas ósseas do que os pacientes com hemofilia moderada ou leve.

Em relação aos marcadores do metabolismo ósseo, estudos têm demonstrado que pacientes com hemofilia apresentam uma maior concentração de marcadores de absorção óssea (osteoclásticos), como *Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP-5b)*, *Collagen Type 1 Cross-Linked C-Telopeptide (CTx)* and *N-telopeptide (NTx)*, quando comparados com controles saudáveis (Katsarou *et al.*, 2010). A concentração de marcadores de formação óssea (osteoblásticos), como *Bone Alkaline Phosphatase (b-ALP)*, mostrou uma associação negativa com o nível de atividade física e o histórico de fratura, assim como uma associação positiva com a severidade da hemofilia e o número de articulações afetadas em adultos com hemofilia (Anagnostis *et al.*, 2013). Os níveis de CTx também foram correlacionados com a DMO, número de articulações acometidas e escore radiológico. Outros marcadores, como a proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP) e produtos da clivagem da cartilagem (C1, 2C), foram propostos como biomarcadores para a avaliação da artropatia hemofílica (Jansen NW *et al.*, 2009; Anagnostis *et al.*, 2013).

1.4 Exercício e hemofilia

As condutas preconizadas após o sangramento intra-articular envolvem a reposição do fator de coagulação deficitário (FVIII ou FIX), curto tempo de repouso da articulação, crioterapia, punção articular (quando necessário), fisioterapia e medicação analgésica (Rodriguez-Merchan *et al.*; Hermans *et al.*, 2011). Dentro do processo de reabilitação e prevenção da artropatia hemofílica, diferentes modalidades de exercícios têm sido recomendadas (Bossard *et al.*, 2008; Blamey *et al.*, 2010; Schafer *et al.*, 2016) com os objetivos de manutenção da força muscular (Hilberg *et al.*, 2001; Tiktinsky *et al.*, 2002; Harris, Boggio *et al.*, 2006; González *et al.*, 2007), evitar retração de tecidos periarticulares e musculares (Buzzard; Heijnen, Kleijn, 1999), melhora da propriocepção (Hilberg *et al.*, 2001) e do equilíbrio (Gallach *et al.*, 2008; Fearn *et al.*; Hill, *et al.*, 2010). Atividades esportivas recreativas

também são indicadas com o objetivo, não só de aumentar a força muscular, flexibilidade e coordenação, mas também com o objetivo de melhora da qualidade de vida e prevenção de doenças crônicas. Entretanto, apesar de serem amplamente recomendados, é necessária cautela na avaliação dos riscos/benefícios específicos para cada tipo de exercício (Mulder *et al.*, 2004; Buzzard; Von-Mackesen *et al.*; Seuser *et al.*, 2007; Heijnen *et al.*, 2008; Gomis *et al.*; Koiter *et al.*, 2009) em função de não haver estudos científicos suficientes para amparar a eficácia de cada modalidade (Hermans *et al.*, 2011).

Estudos com pacientes hemofílicos demonstraram uma capacidade aguda do exercício físico em melhorar os parâmetros de coagulação, incluindo a concentração do FVIII e FvW (von Willebrand), e, de certa forma, poderiam reduzir o risco de sangramento durante a atividade física (Groen *et al.*, 2013, Beltrame *et al.*; Ravanbod *et al.*, 2015). Em pacientes com hemofilia leve ou moderada, foi demonstrado que, além do aumento do FVIII, a atividade do FvW se manteve aumentada por, pelo menos, 4 horas após o exercício, sendo sugerido que este aumento poderia prolongar a meia-vida do fator recombinante administrado antes do exercício e, assim, reduzindo o risco de sangramentos durante a realização da atividade esportiva (Olofsson *et al.*, 2015). Porém, em paciente com hemofilia A grave, apesar de ter sido reportado um aumento na concentração de FvW (Zourikian *et al.*, 2016), nenhuma alteração na meia-vida do FVIII foi identificada (Olofsson *et al.*, 2015; Zourikian *et al.*, 2016).

1.5 Modulação da inflamação pelo exercício

Em outras patologias, inúmeros estudos em humanos e com modelos animais têm demonstrado os benefícios do exercício físico regular, como na artrite reumatoide (VanDen Ende *et al.*, 2000; Bearne *et al.*, 2002), osteoartrose (Ettinger *et al.*, 1997; vanBaar *et al.*, 1998; Frensen *et al.*, 2001), lúpus eritematoso sistêmico (Perandini *et al.*, 2014), miosite (Nader *et*

et al., 2010), problemas cardíacos pós-infarto (Piepoli *et al.*, 2004, Lee *et al.* 2009), doenças isquêmicas do coração (Jolliffe *et al.*, 2000) diabetes tipo I (Thakur, 2016) e tipo II (Boulé *et al.*, 2001), doença pulmonar obstrutiva crônica (Lacasse *et al.*, 2002), alergia pulmonar induzida em camundongos (da Silva *et al.* 2015), doenças neurodegenerativas (Gomes da Silva *et al.*, 2013) e em diversos tipos de câncer, como o de mama (Frajacomo *et al.*, 2015). E, considerando o papel da inflamação na patogenia e progressão dessas doenças, um dos mecanismos apontado como responsável pela melhora da evolução destas doenças seria a capacidade do exercício em modular a inflamação (Barzilay *et al.*, 2001; Libby *et al.*, 2002; Dandona *et al.*, 2004; Petersen; Pedersen *et al.*, 2005; Pedersen, Saltin, 2006; Pedersen, Benatti, 2015).

Esse efeito anti-inflamatório seria mediado pela produção e liberação de citocinas pelo músculo (miocinas), em especial, a IL-6, que, por sua vez, desencadearia um aumento de citocinas com função anti-inflamatória, como IL-1ra e IL-10 (Steensberg *et al.*, 2000; Pedersen, 2008). A liberação de IL-6 pelo músculo é aumentada de maneira exponencial com o exercício e está relacionada à intensidade, à duração e à massa do músculo recrutado (Pedersen, Hoffman-Goetz, 2000; Pedersen *et al.*, 2001; Fabbraio, Pedersen *et al.*, 2002; Pedersen *et al.*, 2003). O efeito anti-inflamatório da IL-6 liberada após o exercício se deve à sua capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-1 β (Schindler *et al.*, 1990; Starkie *et al.*, 2003). A infusão de IL-6 recombinante humana (rhIL-6) inibiu a liberação de TNF α após injeção por LPS (Starkie *et al.*, 2003). Além disto, o aumento em sequência de IL-10 e IL-1ra após o exercício contribui para um efeito anti-inflamatório sistêmico em função da capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e, dessa forma, reduzir a ativação dos granulócitos, monócitos/macrófagos, células *natural killer*, linfócitos B e T, assim como o recrutamento destas para os locais com atividade inflamatória (Moore *et al.*, 1993; Pretolani., 1999). No estudo de Helmark *et al.* (2010), pacientes com osteoartrose (OA) de joelhos apresentaram um aumento dos níveis de IL-10 intra-articular e periarticular após uma série de exercícios

resistidos. A mesma resposta não foi encontrada no grupo-controle com OA que não se exercitou. Deste modo, o aumento intra-articular de IL-10 foi sugerido como uma das explicações para os benefícios encontrados pelos pacientes que praticaram exercícios de forma regular (Lems; den Uyl, 2010), visto que a inflamação articular está diretamente envolvida na progressão da OA (Hedbom; Hauselmann *et al.*, 2002), além da capacidade da IL-10 em inibir as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF α , e modular a homeostase da cartilagem (Schulze-Tanzil *et al.*, 2009).

Fatores mecânicos, indiretos à contração muscular, também podem contribuir para o efeito modulador da inflamação e condroprotetor do exercício em doenças articulares (Sun, 2010). Estudos têm demonstrado que, quando submetidos à tensão, os sinoviócitos, diminuem a produção de prostaglandina E₂ (Sambajon *et al.*, 2003), além de diminuir a expressão de metaloproteinases da matrix quando submetidos à cargas de cisalhamento e tensão (Sun *et al.*, 2003; Sun; Yokota, 2002). Além dos sinoviócitos, os condrócitos também podem reagir às cargas e variações de pressão inibindo a degeneração da matriz extracelular induzida por TNF α (Torzilli *et al.*, 2010). Esses efeitos moduladores sobre a inflamação foram demonstrados também em estudos com movimentos passivo contínuo em que houve uma redução na expressão de IL-1 β e COX-2 pelos condrócitos, e aumento na expressão de IL-10 (Ferretti *et al.*, 2005), além da modulação da nocicepção em função da diminuição da expressão do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (Nakabayashi *et al.*, 2016) após inflamação articular induzida em ratos.

1.6 Justificativa e hipótese do estudo

Apesar dos regimes de profilaxia primária empregados em crianças terem elevado a qualidade de vida e a saúde musculoesquelética dos pacientes com hemofilia (Blanchette *et al.*, 2004; Manco-Johnson *et al.*, 2007), hemartroses de repetição continuam sendo uma das principais

preocupações clínicas devido ao fato de que sangramentos articulares subclínicos (ou pequenas quantidades) podem gerar alterações significativas na articulação (Manco-Johnson *et al.*, 2007). Assim, o exercício físico tem emergido como uma das principais medidas conservadoras para manter uma boa saúde articular (Gomis *et al.*, 2009) e óssea (Forsyth *et al.*, 2011), porém, ainda não há evidências básicas sobre o efeito do exercício físico na inflamação sinovial, na dor, e no metabolismo e densidade mineral óssea, e na degeneração da cartilagem articular induzida por sangue, como é o caso na hemofilia. Deste modo, em função da capacidade do exercício em modular a inflamação e o metabolismo ósseo, nossa hipótese é de que o exercício aeróbico aquático poderia modular a inflamação articular e prevenir alterações na densidade mineral óssea em modelo experimental de hemartrose.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi o de investigar os efeitos do exercício aeróbico aquático sobre a inflamação articular, densidade e metabolismo ósseo após episódios repetitivos de hemartrose induzida experimentalmente em ratos.

3 Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Animais

Projeto submetido ao Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sendo aprovado em sessão de 29/05/2014 sob o Protocolo de Pesquisa no 066/14 (Anexo A).

Foram utilizados 26 ratos *Wistar* machos com idade entre 6 e 8 semanas. Os animais foram mantidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) antes e após o protocolo de exercício físico e no Biotério da Escola de Educação Física e Esportes (EEFE) da Universidade de São Paulo (USP) durante o período de treinamento. Os animais foram mantidos a temperatura (24° C) e umidade (40-60%) controladas com ração e água *ad libitum*. O ciclo claro-escuro de 12 horas padrão foi mantido no Biotério Central da FMUSP e na EEFE o ciclo claro-escuro era invertido. Os animais foram divididos em 3 grupos: Grupo de animais-controles saudáveis de mesma idade (controle C, n=8), grupo submetido à injeção intra-articular de sangue homólogo (hemartrose H, n=8) e grupo submetido à injeção intra-articular de sangue homólogo e protocolo de exercício (hemartrose + exercício HE, n=10). Todos os animais foram pesados semanalmente para avaliação da evolução ponderal.

3.2 Protocolo experimental de hemartrose de repetição

Após sedação com xilazina (10mg/kg) e ketamina (100mg/kg), foi realizada a injeção intra-articular de 0,1ml de sangue autólogo no joelho direito (hemartrose, H). O sangue foi retirado da veia coccígena após breve aquecimento da cauda (lâmpada infravermelha, 100W) imediatamente antes

da injeção na articulação. O joelho esquerdo foi utilizado como controle e injetado com 0,1ml de solução salina (S). As injeções foram realizadas com intervalo de uma semana, durante sete semanas, totalizando 8 infusões (Boettger *et al.*, 2013). O protocolo do estudo está resumido no fluxograma abaixo.

DMO, Densitometria Mineral Óssea; FCR, Frequência Cardíaca de Repouso

3.3 Protocolo de exercício aeróbico aquático

O exercício físico (Grupo HE) foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (Profa. Edilamar Menezes de Oliveira) em um tanque adaptado para ratos durante o ciclo escuro dos animais. Durante esse protocolo, os animais (todos os grupos) permaneceram no biotério da EEFE-USP que possui ciclo invertido de iluminação com o intuito de diminuir o estresse do deslocamento.

Após um período de adaptação ao meio aquático (2 semanas), os animais do Grupo HE foram treinados 5 dias da semana durante 60 minutos por 8 semanas. Foi associada uma carga de 5% do peso corporal presa na cauda de cada animal (ajustado a cada semana) durante as 8 semanas de treinamento. O esquema experimental está ilustrado nas Figuras 1 e 2. Esse

protocolo de treinamento é considerado como de baixa a moderada intensidade e longa duração em função de um aumento na capacidade oxidativa do músculo e tem sido amplamente utilizada (Soci *et al.*, 2011; Barretti *et al.*; Fernandes *et al.*, 2012).

Figura 1 – Vista superior do tanque adaptado.

Figura 2 – Carga de 5% do peso corporal fixada na cauda.

3.4 Marcadores de treinamento físico

A frequência cardíaca de repouso (FCR) e o peso do coração foram utilizados como marcadores da eficácia do treinamento. Foram realizadas as mensurações da FCR utilizando o sistema computadorizado de manguito para cauda (*IITC Life Science Inc. CA USA*) no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (Profa. Edilamar Menezes de Oliveira). Os animais foram aclimatizados ao sistema por 3 dias consecutivos antes da mensuração. Foram realizadas 3 medidas e o resultados expresso como média. Os dados são apresentados em batimentos por minuto (bpm). Após o sacrifício, os corações dos animais foram pesados imediatamente após sua retirada da caixa torácica. A normalização foi feita pelo peso corporal: $[\text{peso do coração (g)}/\text{peso corporal (g)}]*1000$.

3.5 Avaliação da dor

A cinética da dor durante o protocolo foi avaliada por meio do Teste de Incapacitância (Bove *et al.*, 2003, Rutter *et al.*, 2014) utilizando o **Columbus Incapacitance Tester Version 5.5** (*Columbus Instruments, Columbus, OH, EUA*) no Laboratório Especial de Dor e Sinalização do Instituto Butantan, São Paulo (Colaboração da Pesquisadora Dra. Yara Cury). O teste se baseia na alteração de distribuição de peso entre a pata direita (H) e a pata esquerda (S), e foi realizado dentro de uma câmara de acrílico de modo que as patas traseiras ficassem apoiadas em plataformas de força individuais para cada pata (Figura 3). A força exercida por cada pata sobre a plataforma foi mensurada com a precisão de 0,01 g durante um período de 3 segundos. O teste foi repetido 3 vezes consecutivas e o resultado expresso como a média das medidas. Os valores obtidos foram convertidos em porcentagem para normalizar os dados. Sendo assim, o valor de 50% representa uma distribuição de peso simétrica entre as patas. As avaliações semanais foram

realizadas sempre antes da injeção do sangue na articulação dos animais totalizando 8 avaliações. A fórmula utilizada para o cálculo foi:

$$\frac{\text{peso (g) no lado hemartrose} \times 100}{\text{peso (g) no lado hemartrose} + \text{peso (g) no lado salina}}$$

Figura 3 – *Columbus Incapacitance Tester Version 5.*

3.6 Mensuração do diâmetro articular

Para uma estimativa do edema resultante da hemartrose, os diâmetros articulares (mm) dos joelhos foram avaliados ao final do experimento utilizando-se um paquímetro digital (Mitutoyo, CD-6" CSX-B model, Brasil). Logo após a sedação, a pele do joelho foi removida com o auxílio de material cirúrgico e três medidas foram realizadas sendo os resultados expressos como média das medidas.

3.7 Coleta do líquido sinovial

Após o sacrifício, 500µl de solução salina (soro fisiológico) foram injetadas na articulação utilizando uma seringa 30G, em seguida, esse

líquido foi aspirado para recuperação do lavado (Willett *et al.*, 2014). Após centrifugação, as amostras foram armazenadas a -80°C para posterior análise.

3.8 Avaliação da densidade mineral óssea

A avaliação da densidade óssea (DMO) foi realizada no Laboratório de Metabolismo Ósseo (LIM-17) da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Pesquisadora Responsável: Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira) por meio de exame de densitometria de dupla emissão de fonte de raios-X (DXA) utilizando o densitômetro *Hologic Discovery A* (Bedford, Massachusetts, EUA) e um programa desenvolvido para análise de dados em pequenos animais (*Hologic Apex Software*, versão 4.0.2) (Figura 4).

Foram analisadas 4 regiões: corpo total, fêmur, tíbia e uma combinação da região distal do fêmur e proximal da tíbia (articulação do joelho). O exame foi realizado antes e depois do protocolo de exercício aeróbico aquático.

Figura 4 – Densitômetro *Hologic Discovery A* (Bedford, Massachusetts, EUA).

3.9 Eutanásia

Após a sedação padrão com xilazina (10mg/kg) e ketamina (100mg/kg), foi, então, administrada uma dose adicional (dobro da dose padrão) para o sacrifício dos animais. Após ausência do reflexo de retirada da pata após estímulo álgico na região entre os metatarsos, foi, então, exposto o peritônio e realizada a coleta de sangue via artéria aorta descendente. O sangue coletado, com seringa heparinizada, foi colocado em banho de gelo até separação do plasma que aliquotado foi mantido a -80°C.

3.10 Ensaio multiplex para detecção da concentração de citocinas

O plasma dos animais bem como o lavado sinovial coletados ao final do experimento foram avaliados quanto à produção das seguintes citocinas: IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, MCP-1, VEGF, TNF- α e IFN- γ por ensaio multiplex, de acordo com protocolo do fabricante Millipore (Billerica, MA, USA).

3.11 Protocolo de ELISA para marcadores do metabolismo ósseo e hormônios

As concentrações plasmáticas dos hormônios: adrenocorticotrófico (ACTH), corticosterona e melatonina, assim como dos marcadores do metabolismo ósseo P1NP (*total procollagen type 1 N-terminal propeptide*) e CTX (*C-terminal telopeptide*). Foram avaliadas por meio da ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*).

3.12 Análise estatística

Para as análises plasmática das citocinas, hormônios e marcadores de formação óssea, FCR e peso normalizado do coração, foram realizadas análises de variância simples (ANOVA) com um fator (one-way), utilizando-se o procedimento PROC GLM do *software* SAS versão 9.4 após a demonstração de que os resíduos apresentaram uma distribuição normal com variância constante. Foram utilizados como pós-teste os contrastes ortogonais.

Para as análises dos dados referentes à densitometria óssea, citocinas intra-articular, dor e evolução ponderal, foi utilizado o modelo linear de efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos). O ajuste do modelo foi feito pelo procedimento PROC MIXED do *software* SAS 9.2.

Para as análises, foi adotado o nível de significância de $\alpha = 0,05^*$.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Evolução ponderal

A Figura 5 mostra a evolução ponderal dos grupos experimentais ao longo de 8 semanas. Os três grupos experimentais ingressaram no estudo com pesos equivalentes (C: $188,2 \pm 10,9\text{g}$, H: $192,6 \pm 10,2\text{g}$ e HE: $176,2 \pm 14,4\text{g}$; $p=0,304$) e ganharam peso de forma semelhante até a 5ª semana ($p=0,181$). A partir da 6ª semana de treinamento, o Grupo HE ganhou menos peso em relação ao Grupo C ($p=0,041$) e ao Grupo H ($p=0,049$). Essa diferença no ganho de peso entre os grupos se manteve significativo na 7ª e 8ª semanas.

Figura 5 - Evolução ponderal dos animais do Grupo Controle (n=8), Grupo Hemartrose (n=8) e Grupo Hemartrose + Exercício (n=10). Os resultados estão expressos como média $\pm$ d.p.m. * $p<0,05$ C vs.HE e # $p<0,05$ H vs HE.

4.2 Marcadores do treinamento físico

O protocolo de exercício aquático resultou em uma menor FCR no Grupo HE ($335,6 \pm 12,0$ bpm) quando comparado ao Grupo C ($398,0 \pm 12,0$

bpm) e ao Grupo H ($404,7 \pm 10,7$ bpm) (HE vs. C: $p=0,019$; HE vs H: $p=0,001$). O peso do coração normalizado pelo peso corporal foi maior no Grupo HE ($3,9 \pm 0,4$ g) que no Grupo C ($2,8 \pm 0,2$ g) e Grupo H ($3,0 \pm 0,3$ g) (HE vs. C: $p<0,001$; HE vs H: $p=0,003$).

4.3 Diâmetro articular

Após o término do protocolo de exercício aeróbico aquático, o joelho com hemartrose do Grupo H apresentou um diâmetro médio ($13,14 \pm 1,3$ mm) significativamente maior que o Grupo HE ($11,16 \pm 0,97$ mm) ($p=0,009$) e em relação ao Grupo C ($11,01 \pm 1,12$ mm) ($p=0,008$). O diâmetro dos joelhos injetados com salina nos grupos experimentais H ($10,75 \pm 0,85$ mm) e HE ($10,5 \pm 1,02$ mm) não apresentaram diferenças entre si ($p=0,628$) e em relação ao controle ($10,97 \pm 1,08$ mm) (C vs. H: $p=0,701$; C vs. HE: $p=0,367$) (Figura 6).

Figura 6 - Diâmetro articular dos joelhos (salina e hemartrose) dos animais dos Grupos C (Controle, $n=8$), H (Hemartrose, $n=8$) e HE (Hemartrose + Exercício $n=10$) após 8 semanas de treinamento aquático. Os resultados estão expressos como média $\pm$ d.p.m. * $p<0,05$ vs. C; # $p<0,05$ vs. HE.

A Figura 7 mostra a variação entre o diâmetro do joelho hemartrose e o joelho salina de cada grupo (intragrupo). A injeção de sangue homólogo durante 8 semanas promoveu um aumento no diâmetro articular no joelho hemartrose dos animais do Grupo H ($\Delta=2,01 \pm 0,26\text{mm}$) e do Grupo HE ($\Delta=0,73 \pm 0,11$). A variação do diâmetro do joelho esquerdo e direito do Grupo C ($\Delta=0,4 \pm 0,1$) foi diferente da variação obtida no Grupo H ($p<0,0001$) e Grupo HE ($p=0,004$). A variação entre os Grupos H e HE mostra que o exercício aquático foi eficaz em promover a redução do diâmetro do joelho com hemartrose (HE vs H, $p<0,0001$).

Figura 7 – Variação do diâmetro articular (Δ = diâmetro do joelho hemartrose – joelho salina) nos animais do Grupo C (n=8), H (n=8) e HE (n=10) ao término do protocolo de exercício aquático. Os resultados estão expressos como média $\pm$ d.p.m. * $p<0,05$ vs. C # $p<0,05$ vs HE.

4.4 Avaliação da dor

A Figura 8 ilustra a variação da descarga de peso ao longo das 8 semanas registrada no membro no qual foi induzido experimentalmente a hemartrose nos grupos H e HE. O membro direito do Grupo-controle (C) foi

usado como referência de normalidade. Na primeira avaliação, feita uma semana antes da indução da hemartrose, os 3 grupos não apresentaram diferenças significativas no índice de dor (C vs. H: $p=0,74$; C vs. HE: $p=0,72$ e H vs. HE $p=0,95$) evidenciada pela homogeneidade na descarga de peso entre os animais. Já na segunda avaliação (2ª Semana), os Grupos H e HE diminuíram significativamente a descarga de peso no lado experimental quando comparado ao Grupo-controle (C vs H: $p=0,005$ e C vs HE: $p<0,001$). Entretanto, quando comparados entre si, o efeito do exercício ainda não foi notado (H vs HE: $p=0,072$). A partir da 3ª avaliação até o final do experimento, ambos os grupos experimentais (H e HE) mantiveram uma menor descarga de peso comparado com o Grupo C ($p<0,0001$). A partir da terceira semana até a última avaliação, o Grupo H apresentou uma redução na descarga de peso maior que a observada no grupo submetido ao exercício aquático (HE) ($p<0,0001$).

Figura 8 – Cinética da dor nas articulações com hemartrose dos Grupos Controle (n=8), Hemartrose (n=8) e Hemartrose + Exercício (n=10) durante 8 semanas do protocolo de exercício aquático. Os valores estão expressos como média $\pm$ d.p.m. * $p<0,005$ C vs H e HE, # $p<0,0001$ H vs HE.

4.5 Avaliação do líquido sinovial

4.5.1 Produção de citocinas

Não foram encontradas nenhuma diferença significativa nas citocinas avaliadas nos joelhos injetados com salina (Grupo H e HE) e o joelho direito do Grupo C que foi utilizado como controle.

Porém, quando comparada a média das concentrações das citocinas no lavado do joelho com hemartrose, foi observada uma diferença significativa na IL-4 entre o Grupo H ($36,54 \pm 13,62\text{pg/mL}$) e HE ($139,45 \pm 24,48\text{pg/mL}$) (H vs. HE: $p=0,018$) e C ($121,83 \pm 50,43\text{pg/mL}$) (H vs. C: $p=0,008$) Figura 9.

Figura 9 – Concentração Média (+DP) no Lavado do Líquido Sinovial da Citocina IL-4 nos Grupos Controle (C), Hemartrose (H) e Hemartrose Exercício (HE). * $p<0,02$ vs. C e HE.

O mesmo padrão foi observado na citocina IL-10 em que o Grupo HE ($251,58 \pm 24\text{pg/mL}$) e o Grupo C ($182,37 \pm 97,46\text{pg/mL}$) apresentaram uma concentração significativamente maior que o Grupo H ($48,11 \pm 15,84\text{pg/mL}$) (C vs H: $p=0,01$ e H vs HE: $p=0,008$) (Figura 10).

Figura 10 - Concentração Média (+DP) no Lavado do Líquido Sinovial da Citocina IL-10 nos Grupos Controle (C), Hemartrose (H) e Hemartrose Exercício (HE). * $p < 0,01$ vs. C e HE.

4.5.2 MCP-1

As comparações entre os Grupos mostraram uma concentração elevada de MCP-1 no joelho direito (lado experimental do Grupo H e HE) no Grupo H $419,86 \pm 128,55$ pg/mL quando comparado com os Grupos C ($291,86 \pm 87,89$ pg/mL) ($p=0,036$) e HE ($219,95 \pm 88,42$ pg/mL) ($p=0,001$) (Figura 11).

Figura 11 - Concentração Média (+DP) de MCP-1 obtida no lavado do líquido sinovial nos Grupos Controle (C), Hemartrose (H) e Hemartrose Exercício (HE). * $p=0.036$ vs. C. # $p=0,001$ vs. HE.

As comparações realizadas intragrupo (joelho direito vs joelho esquerdo) mostraram uma elevada concentração de MCP-1 no lado em que foi induzida experimentalmente a hemartrose nos Grupos H (aumento de $234,33 \pm 41,36$ pg/mL no lado hemartrose) e HE (aumento de $63,53 \pm 34,60$ pg/mL no lado hemartrose), porém somente o aumento registrado no Grupo H foi considerado significativo pelo teste estatístico ($p<0,0001$).

4.5.3 VEGF

A análise descritiva dos níveis de VEGF no líquido sinovial de cada Grupo está na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração de VEGF encontrada no lavado sinovial.

Grupo	Joelho	N	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
C	D	7	35.19	19.79	17.86	32.14	74.81
	E	7	30.7	11.9	8.95	31.1	41.68
H	D	10	83.12	42.64	39.92	61.58	146
	E	10	50.5	23.38	14.05	49.07	106
HE	D	7	49.18	15.7	28.23	57.69	68.6
	E	7	36.64	17.77	0	40.1	55.24

C, Controle. H, Hemartrose. HE, Hemartrose Exercício. D, Direito. E, Esquerdo. Valores expressos como média $\pm$ DP.

Quando comparadas as concentrações de VEGF no lavado do líquido sinovial do lado direito (lado experimental dos Grupos H e HE), o Grupo H apresentou uma maior concentração em relação ao Grupo C ($83,12 \pm 42,64$ pg/mL vs. $35,19 \pm 19,79$ pg/mL, $p=0,0011$) e ao Grupo HE ($83,12 \pm 42,64$ pg/mL vs. $49,18 \pm 15,7$ pg/mL, $p=0,0142$) (Figura 12).

Figura 12 - Concentração Média (+DP) de VEGF obtida no lavado do líquido sinovial nos Grupos Controle (C), Hemartrose (H) e Hemartrose Exercício (HE). * $p=0.0011$ vs. C. # $p=0,0142$ vs. HE.

As comparações realizadas intragrupo (joelho direito vs joelho esquerdo) mostraram uma elevada concentração de VEGF no lado em que foi induzida experimentalmente a hemartrose nos Grupos H ($32,61 \pm$

11,52pg/mL) e HE ($12,54 \pm 3,77$ pg/mL), porém somente o aumento registrado no Grupo H foi considerado significativo pelo teste estatístico ($p=0,01$).

4.6 Avaliação das citocinas plasmáticas

Na Tabela 2, estão apresentadas concentrações de citocinas plasmáticas detectadas nos 3 grupos experimentais ao final do experimento.

Tabela 2 - Concentração plasmática das citocinas.

Citocina (pg/ml)	Controle (n=8)	Hemartrose (n=8)	Hemartrose + Natação (n=10)	p (ANOVA)
IL-1 α	2,8 $\pm$ 1,87	10,9 $\pm$ 9,54	5,51 $\pm$ 4,94	0,060
IL-4	23,61 $\pm$ 15,88	6,81 $\pm$ 10,22	27,77 $\pm$ 11,54	0,008*
IL-6	165,66 $\pm$ 294,67	34,9 $\pm$ 92,2	231,43 $\pm$ 325,19	0,380
IL-10	70,21 $\pm$ 37,58	18,88 $\pm$ 10,01	74,89 $\pm$ 87,2	0,163
IFN γ	19,87 $\pm$ 47,72	25,41 $\pm$ 31,69	21,38 $\pm$ 40,4	0,965
IL-17A	18,38 $\pm$ 4,74	30,27 $\pm$ 10	24,14 $\pm$ 12,41	0,110
TNF- α	2,63 $\pm$ 0,91	5,08 $\pm$ 2,01	3,35 $\pm$ 1,78	0,031*

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão da média.

As linhas sombreadas na Tabela 2 evidenciam a diferença entre os valores de IL-4 ($p=0,008$) e TNF- α ($p=0,031$) entre os grupos. O pós-teste (contrastes ortogonais) mostrou que animais com hemartrose (Grupo H) apresentaram uma concentração menor de IL-4 (Figura 13) e maior de TNF- α (Figura 14) quando comparados aos animais-controle ($p=0,021$ e $0,011$, respectivamente) e submetidos ao exercício ($p=0,002$ e $0,045$, respectivamente).

Figura 13 - Concentração Média (+DP) Plasmática da Citocina IL-4 nos Grupos Controle (C), Hemartrose (H) e Hemartrose Exercício (HE). * $p=0,021$ vs C e # $p=0,002$ vs. HE.

Figura 14 - Concentração Média (+DP) Plasmática da Citocina TNF- α nos Grupos Controle (C), Hemartrose (H) e Hemartrose Exercício (HE). * $p=0,011$ vs C e # $p=0,045$ vs. HE.

Não foram encontradas diferenças significativas na concentração de IL-4 e TNF- α entre os Grupos C e HE ($p=0.5108$ e $p=0.3852$, respectivamente).

4.6.1 MCP-1

A análise da concentração plasmática de MCP-1 demonstrou como significativas as diferenças encontradas entre as médias obtidas do Grupo H ($639,86 \pm 263,83\text{pg/mL}$) com o Grupo C ($390 \pm 120,97\text{pg/mL}$) e o Grupo HE ($433,1 \pm 136\text{pg/mL}$), em que o Grupo C apresentou uma maior concentração plasmática de MCP-1 do que os outros grupos (Figura 15).

Figura 15 - Concentração Média (+DP) Plasmática de MCP-1 nos Grupos Controle (C), Hemartrose (H) e Hemartrose Exercício (HE). * $p=0,016$ vs. C. # $p=0,028$ vs. HE.

4.6.2 VEGF

Não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações médias de VEGF plasmática quando comparados pela ANOVA os Grupos C ($30,18 \pm 9,5\text{pg/mL}$), H ($24,04 \pm 5,5\text{pg/mL}$) e HE ($34,25 \pm 11,88\text{pg/mL}$) ($p=0,129$).

4.6.3 Hormônios

Não foram detectadas diferenças entre os valores de ACTH e Corticosterona plasmático entre os grupos. A concentração de Melatonina plasmática no grupo de animais submetidos ao exercício aeróbico aquático (HE: $15,26 \pm 12,06$ pg/ml) foi elevada quando comparada à observada nos animais com hemartrose ($4,47 \pm 1,4$ pg/ml) ($p=0,019$) (Figura 16).

Figura 16 - Concentração plasmática de Melatonina nos Grupos Controle (C), Hemartrose (H) e Hemartrose Exercício (HE). * $p=0,04$ vs. H. os resultados estão expressos como média $\pm$ d.p.m.

4.7 Avaliação óssea

4.7.1 Densidade mineral óssea (DMO)

As DMO iniciais dos 3 grupos experimentais foram equivalentes em todos os sítios avaliados (fêmur, joelho, tíbia e corpo total). Os três grupos experimentais apresentaram um aumento na DMO do corpo total quando comparados os valores obtidos na primeira e na última avaliação realizada após o protocolo de exercício: C ($p<0.0001$), H ($p<0.0001$) e HE ($p<0.0001$). Entretanto, a DMO do corpo total foi maior no grupo-controle que nos grupos

H ($p=0.009$) e HE ($p=0.022$). Nenhuma diferença foi encontrada entre a DMO dos Grupos H e HE ao final do protocolo ($p=0.858$)

Todas as regiões avaliadas nos três grupos apresentaram um aumento na DMO entre as medidas iniciais e finais. Entretanto, o grupo H apresentou, no membro com hemartrose, uma redução da DMO em todos os sítios avaliados (fêmur, tíbia e joelho). Animais submetidos à realização do exercício aquático apresentaram valores de DMO semelhantes aos observados em animais-controle nos 3 sítios avaliados, (fêmur, $p=0.772$, tíbia, $p=0.277$, articulação do joelho, $p=0.544$) (Figura 17).

Figura 17 - Densidade mineral óssea antes e após o protocolo de 8-semanas de exercício aquático no fêmur (painel A), tíbia (painel B) e articulação do joelho (painel C) no membro com hemartrose dos Grupos H e HE. Grupo C (n=8), H (n=8) e HE (n=10). * $p<0.0001$ vs. C, # $p<0.0001$ vs. HE. Os dados estão expressos como média $\pm$ dpm.

4.7.2 Marcadores do metabolismo ósseo

Na Figura 18, estão apresentadas as concentrações de P1NP plasmático detectados nos 3 grupos experimentais. O marcador foi reduzido em animais com hemartrose (36.46 ± 3.82 ng/mL) quando comparado aos valores detectados em animais-controle (48.11 ± 7.79 ng/mL, $p=0.017$). Animais submetidos ao protocolo de exercício aquático apresentaram valores de P1NP similares ao registrado no grupo-controle normal (50.52 ± 10.77 ng/mL, $p=0.568$).

Figura 18 - Concentração plasmática de P1NP nos Grupos-Controle (C; n=8), Hemartrose (H; n=8) e Hemartrose + Exercício (HE; n=10). Resultados estão expressos como média $\pm$ d.p.m. * $p<0.01$ vs. C, # $p<0.01$ vs. HE.

Na Figura 19, estão apresentadas as concentrações de CTX plasmático detectados nos 3 grupos experimentais. O marcador se apresentou aumentado em animais com hemartrose (161.77 ± 27.25 ng/mL) quando comparado aos valores detectados em animais-controle (104.66 ± 35.58 ng/mL, $p=0.0004$) e com o grupo dos animais submetidos ao exercício aeróbico aquático (111.33 ± 11.93 ng/mL, $p=0.0006$).

Figura 19 - Concentração plasmática de CTX nos Grupos-controle (C; n=8), Hemartrose (H; n=8) e Hemartrose + Exercício (HE; n=10). Resultados estão expressos como média $\pm$ d.p.m. * $p < 0.01$ vs. C, # $p < 0.01$ vs. HE.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

O protocolo de exercício aeróbico aquático empregado neste estudo realizado durante 8 semanas em ratos com hemartrose induzida foi eficaz na modulação da nocicepção, inflamação articular, redução do edema e preveniu a perda óssea consequente à hemartrose

A utilização de um modelo experimental para o estudo proposto é de grande valia por permitir que vários parâmetros de inflamação intra-articular sejam avaliados. Outro ponto a ser destacado é a vantagem de comparar grupos de animais inicialmente pareados por peso e DMO, e, assim, termos a possibilidade de avaliar o efeito real das hemartroses de repetição e do exercício aeróbico na perda óssea. A escolha da modalidade aquática de exercício aeróbico foi a escolhida para reduzir o risco de lesões adicionais à cartilagem em função de cargas compressivas associadas à presença de sangue na cavidade articular (Hooiveld *et al.*, 2004). Adicionalmente, este protocolo experimental, de intensidade moderada, é amplamente utilizado por ser eficaz no treinamento e condicionamento de ratos, além de promover adaptações fisiológicas compatíveis às observadas em humanos, como, por exemplo, redução da frequência cardíaca de repouso, aumento da capacidade aeróbica e hipertrofia do ventrículo esquerdo (Medeiros *et al.*, 2004; Barretti *et al.*; Fernandes *et al.*, 2012). Uma das limitações do estudo foi o modelo animal utilizado (ratos wistar selvagem) visto que estes possuem o processo de coagulação e cicatrização normal diferentemente dos modelos knockout-FVIII que apresentam uma taxa mais lenta da resolução da inflamação e reparo tecidual (Hoffman *et al.*, 2006 (McDonald *et al.*, 2007, Hoffman M, 2008), o que poderia alterar o comportamento dos animais durante o protocolo de exercício aquático e gerar diferentes resultados. Assim, futuros estudos com modelos knockout (FVIII-IX) são necessários para avançar o conhecimento dos efeitos de diferentes modalidades de exercício na progressão da artropatia hemofílica.

Estudos experimentais em camundongos knockout-FVIII (Hakobyan *et al.*, 2008) e modelos wild-type, além de ratos (Boettger *et al.*, 2013), coelhos (Ravanbod *et al.*, 2011) e cães (Hooiveld *et al.*, 2004) com infusão de sangue no espaço intra-articular vêm sendo utilizados na investigação do processo de destruição da articulação que ocorre na hemartrose hemofílica (Jansen *et al.*, 2008). Porém, estes estudos têm sido direcionados apenas para a avaliação de terapias medicamentosas. A exemplo, Ovlisen *et al.*, em 2008, promoveu a reposição dos fatores de coagulação em animais knockouts. Em outro trabalho recente, investigou-se a ação de anti-inflamatórios com IL-10 e IL-4 recombinante em modelo animal (van Meegeren *et al.*, 2013). Nosso estudo foi o primeiro a usar um modelo animal de hemartrose-experimental para avaliar os efeitos do exercício aeróbico na inflamação articular, nocicepção e DMO.

Considerando o fato de que a natação é um dos esportes mais recomendados para pessoas com hemofilia pelo fato do baixo risco de lesão articular (Calefi *et al.*, 2006; Gomis *et al.*, 2009), o emprego desse modelo de exercício nos parece altamente acertado. Os efeitos do exercício aeróbico aquático na densidade mineral óssea ainda são bastante controversos em função da ausência de cargas compressivas durante sua execução (Gómez-Bruton *et al.*, 2013). Em pessoas saudáveis, parece que a natação pode melhorar o metabolismo ósseo e a DMO em regiões específicas dos membros inferiores e superiores (Dook *et al.*, 1997; Magkos *et al.*, 2007; Maimoun *et al.*, 2013). Entretanto, parece não alterar a DMO no corpo total (Andreoli *et al.*, 2012) ou, até mesmo, diminuir a DMO total em atletas profissionais que passam horas diárias em ambiente aquático com diminuição da ação da gravidade (McCulloch *et al.*, 1992; Bellew & Gehrig, 2006; Magkos *et al.*, 2007; Gruodyte *et al.*, 2010). Em nosso estudo, durante o período experimental, todos os animais apresentaram um ganho de DMO (corpo total) de forma semelhante, apesar de o Grupo-controle apresentar um ganho ósseo maior em todos os segmentos avaliados.

Demonstramos, adicionalmente, que o protocolo de exercício aeróbico aquático foi capaz de prevenir a perda de massa óssea no membro com

hemartrose. Esses efeitos podem ser atribuídos, provavelmente, por um aumento da atividade muscular nas patas traseiras durante a natação (Magkos *et al.*, 2007) e por uma modulação sistêmica dos marcadores do metabolismo ósseo. O aumento de marcadores de formação e redução de reabsorção também foi descrito em mulheres menopausadas submetidas a um programa de exercícios aquáticos de alta intensidade (Moreira *et al.*, 2004). Nesse estudo, foi observado um aumento de P1NP e um menor aumento na concentração de CTX quando comparado como grupo-controle. Outros marcadores da formação óssea como a fosfatase alcalina específica do osso (B-ALP) (Lima *et al.*, 2001) e osteocalcina (OC) (Maimoun *et al.*, 2004) também apresentaram níveis mais altos em nadadores, entretanto nenhuma alteração na DMO corporal foi observada (Matsumoto *et al.*, 1997).

Nossos resultados mostram um impacto positivo do exercício aeróbico aquático sobre a dor e o edema articular, importantes sinais de inflamação. Em pacientes hemofílicos, a artropatia desenvolvida após múltiplos sangramentos leva a um aumento da dor (Teyssler *et al.*, 2014) o que contribui para uma redução na qualidade de vida, principalmente no caso da hemofilia severa (Poon *et al.*, 2012). O aumento das citocinas IL-4 e IL-10 no lavado sinovial de animais que nadaram durante 8 semanas, sugere a participação dessas citocinas anti-inflamatórias na modulação da dor. Estudos anteriores mostram que a administração local de IL-4 e IL-10 reduziram de maneira dose-dependente a hiperalgesia induzida por bradicinina, TNF- α e IL-1 β na região da pata em ratos (Poole *et al.*, 1995; Cunha *et al.*, 1999) e a hiperalgesia induzida por ácido acético e zimozan no joelho de ratos (Vale *et al.*, 2003). Além disso, a IL-10 endógena foi demonstrada como capaz de modular a hiperalgesia muscular induzida por exercício aeróbico aquático em camundongos por limitar o estresse oxidativo e a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α e TNF α (Borghi *et al.*, 2015). A IL-10 também apresentou capacidade inibitória da hiperalgesia mecânica induzida por veneno de cobra (via fosfolipase A2) em ratos (Chacur *et al.*, 2004) e foi implicada como uma ferramenta terapêutica para a modulação da dor inflamatória (Verri *et al.*, 2006). Finalmente, a presença de

sinovite crônica também é associada a mudanças expressivas na liberação de neurotransmissores e neuromoduladores (Niissalo *et al.*, 2002), assim, a redução na inflamação articular neste estudo pode ter contribuído para essa modulação.

O aumento demonstrado aqui da IL-4 e IL-10 intra-articular em função do exercício aeróbico aquático pode exercer um efeito positivo após episódios de hemartrose visto que foi demonstrado *in vitro* um aumento da taxa de síntese de proteoglicanas na cartilagem e redução das citocinas pró-inflamatória TNF- α e IL-1 β no tecido sinovial de pacientes hemofílicos submetidos à artroplastia total de joelho (Jansen *et al.*, 2008). Além disso, foi demonstrado *in vivo* usando camundongos knockout-FVIII, que a administração de IL-4 sozinha ou combinado com IL-10 (Van Meegeren *et al.*, 2012; Van Meegeren *et al.*, 2013) pode reduzir os danos da cartilagem articular após episódios de hemartrose induzida experimentalmente.

Nosso protocolo também foi capaz de reduzir as concentrações de VEGF e MCP-1 no líquido sinovial. A concentração de MCP-1 elevada já havia sido descrita em animais knockout-FVIII com hemartrose (Ovlisen *et al.*, 2009) e sua redução plasmática, e, no lavado sinovial, no grupo em que realizou o protocolo de exercício aeróbico aquático, pode ter contribuído para a redução da inflamação sinovial em função do seu papel no recrutamento de monócitos para a cavidade articular (Ovlisen *et al.*, 2009). Em relação ao VEGF, alterações nas concentrações sistêmica e no tecido sinovial têm sido descritas tanto em camundongos knockout-FVIII (Sen., 2013; Bhat *et al.*, 2015) quanto em adultos com hemofilia, e foram correlacionados com o grau de lesão articular e da progressão da artropatia hemofílica (Acharya *et al.*, 2011; Zetterberg *et al.*, 2014). Além disto, a proliferação sinovial, característica da sinovite hemofílica, foi bloqueada após a inibição de VEGF, mostrando seu papel crucial na progressão dessas alterações (Acharya *et al.*, 2011). Apesar da angiogênese estar envolvida em diversos eventos fisiológicos, como o desenvolvimento de órgãos, a reprodução, a cicatrização e, até mesmo, aumentar em resposta ao exercício aeróbico (Lopez-Lopez *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2006), a

neovascularização descontrolada pode contribuir na evolução e nos sintomas de algumas doenças, como artrite reumatoide, psoríase e osteoartrose (Koch, Distler, 2007; Chua, Arbiser, 2009; Ashraf *et al.*, 2011). A redução do VEGF em nosso estudo pode ter sido ocasionada indiretamente em função da modulação da inflamação articular visto que a angiogênese é aparentemente dependente da inflamação (Walsh *et al.*, 2007) e pode ser mediada por diversos fatores, incluindo citocinas pró-inflamatórias e componentes da matriz extracelular (Szekanecz, Kock, 2001). Essa redução do VEGF em função do exercício aeróbico já foi demonstrado em algumas patologias como em tumores de camundongos com câncer de mama (Shalamzari *et al.*, 2014) e pacientes pós-infarto (Lee *et al.*, 2009).

A ausência de alterações nos níveis de glicocorticoide endógeno, tanto pela hemartrose quanto pelo exercício, praticamente, exclui a participação do eixo hipotálamo hipófise adrenal no efeito anti-inflamatório crônico do exercício aeróbico aquático (Saad Rached *et al.*, 2010). Dentre os hormônios analisados, verificamos uma elevação da Melatonina em animais submetidos ao protocolo de exercício. Corroborando esse dado, o exercício tem sido mostrado como sendo capaz de alterar o ritmo circadiano da melatonina com consequente variação da concentração do hormônio em modelos animais (Díaz López e Colmenero Urquijo, 2007) quanto em humanos (Miyazaki *et al.*, 2001; Barger *et al.*, 2004). Em modelos animais, o nível de melatonina plasmática sofreu uma depressão aguda imediatamente após o exercício aquático, porém sua concentração aumenta significativamente após 24 horas retornando aos valores pré-exercício 48 horas após o término do protocolo (Uzun *et al.*, 2012). Corroborando com nossos resultados, do efeito do exercício físico sobre a concentração plasmática de melatonina, têm sido descritos níveis mais altos em indivíduos saudáveis (Lee *et al.*, 2014) e com distúrbios do sono submetidos a treinamento físico (Cai *et al.*, 2014) ou em atletas jovens (Díaz *et al.*, 1993) e adultos ciclistas (Serrano *et al.*, 2010). Em estudos com lesões hepáticas e cardíacas induzidas em animais, a melatonina apresentou efeito anti-

inflamatório modulando a expressão de NF- κ B e reduzindo a produção de citocinas inflamatórias como o TNF- α (Jung *et al.*; Veneroso *et al.*, 2009). Essa via pode ser a mesma ativada em nosso estudo em que a concentração plasmática de TNF- α foram menores nos animais que realizaram o exercício físico.

Em conjunto, nossos dados mostram a eficácia do exercício aeróbico aquático para o tratamento da artropatia hemofílica e abre grandes perspectivas para a discussão da prática de exercícios para pessoas com hemofilia. Futuros estudos com modelos knockout (FVIII-IX) e com humanos com hemofilia são necessários para avançar o conhecimento dos efeitos de diferentes modalidades de exercício na progressão da artropatia hemofílica e na densidade mineral óssea.

6 Conclusão

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que o protocolo de exercício aeróbico aquático empregado em ratos submetidos à hemartrose experimental foi eficiente na modulação local da inflamação articular em função de um aumento das concentrações de IL-4, IL-10 e redução de MCP-1 e VEGF no lavado sinovial, além de reduzir a dor. O protocolo de exercício empregado neste estudo também foi capaz de prevenir as alterações na densidade mineral óssea ocasionada pela hemartrose e modular o metabolismo ósseo por meio de um aumento de P1NP e redução do CTX. Esses resultados mostram a capacidade do exercício em atenuar os efeitos deletérios das hemartrose de repetição na articulação e no tecido ósseo.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética.

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 29/05/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **066/14** intitulado: **“O EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA PROGRESSÃO DA ARTROPATIA INDUZIDA POR HEMARTROSE EM RATOS WISTAR”** que utilizará **36** animais da espécie **Rato**, apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Suzana Beatriz Veríssimo de Mello

Pesquisador (a) Executante: Fábio Melo Bessa de Souza

CEUA-FMUSP, 29 de Maio de 2014.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

7.2 ANEXO B - Carta de premiação do trabalho em um Congresso Internacional da Federação Mundial de Hemofilia 2016, Orlando, Flórida, EUA, como um dos 10 melhores na categoria *Young Research*.

June 29, 2016

Mr. Fabio Souza
PhD Student
University of Sao Paulo
1 Rua Martim Francisco, 100 Apto 53
Sao Paulo, Brazil 01226000

Dear Mr. Souza,

On behalf of the WFH 2016 Congress Program Committee, congratulations on being selected as one of the top 10 recipients of the Young Researcher Award for your abstract on **"Decrease in joint inflammation, swelling and pain after a swimming protocol in animal model of experimental-induced hemarthrosis"**.

The award recognizes the top young researchers (graduate students or postdoctoral fellows) who have submitted highly rated abstracts as a primary author and presenter in any discipline involving hemophilia and other related bleeding disorder.

Winners will receive a certificate of recognition for their abstract submission.

The 10 award winners will be announced in the Congress electronic newspaper (2 weeks prior to the Congress), as well as on the day of their presentation. We will announce the winners during the WFH Awards Ceremony on Thursday, July 28 at 12:30- 14:00. Winners are not obliged to attend this ceremony.

Free paper presenters will also be recognized by the session chair in their introduction.

Your certificate of recognition will be available in the Speaker Resource Centre in room 208A at the Orange County Convention Center during Congress hours.

Congratulations once again and we look forward to seeing you in Orlando.

Yours sincerely,

Ms. Pamela Wilton
Board Member, WFH
Multidisciplinary Program Co-Chair
WFH 2016 World Congress

Mr. James Munn
Multidisciplinary Program Co-Chair
WFH 2016 World Congress

WFH 2016 World Congress, 1425 René-Lévesque Blvd. West, Suite 1010, Montréal, Québec H3G 1T7 Canada

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

Acharya SS, Kaplan RN, Macdonald D, Fabiyi OT, DiMichele D, Lyden D. Neoangiogenesis contributes to the development of hemophilic synovitis. *Blood*. 2011 Feb 24;117(8):2484-93.

Aledort LM, Haschmeyer RH, Pettersson H. A longitudinal study of orthopaedic outcomes for severe factor-VIII-deficient haemophiliacs. The Orthopaedic Outcome Study Group. *J Intern Med*. 1994;236(4):391-9.

Almeida PW, Gomes-Filho A, Ferreira AJ, Rodrigues CE, Dias-Peixoto MF, Russo RC, et al. Swim training suppresses tumor growth in mice. *J Appl Physiol*. 2009;107(1):261-5.

Anagnostis P, Vakalopoulou S, Vyzantiadis TA, Charizopoulou M, Karras S, Goulis DG, et al. The clinical utility of bone turnover markers in the evaluation of bone disease in patients with haemophilia A and B. *Haemophilia*. 2014;20(2):268–275.

Andreoli A, Celi M, Volpe SL, Sorge R, Tarantino U. Long-term effect of exercise on bone mineral density and body composition in post-menopausal ex-elite athletes: a retrospective study. *Eur J Clin Nutr*. 2012;66(1):69-74.

Araujo G, Papoti M, Manchado-Gobatto F, de Mello M, Gobatto C. Standardization of an Experimental Periodized Training Protocol in Swimming Rats. *Rev Bras Med Esp*. 2010;16(1):51-6.

Arnold WD, Hilgartner MW. Hemophilic arthropathy. Current concepts of pathogenesis and management. *J Bone Joint Surg Am*. 1977;59(3):287-305.

Ashraf S, Mapp PI, Walsh DA. Contributions of angiogenesis to inflammation, joint damage, and pain in a rat model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2011;63(9) 2700-10

Barger LK, Wright KP Jr, Hughes RJ, Czeisler CA. Daily exercise facilitates phase delays of circadian melatonin rhythm in very dim light. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;286(6):R1077-84.

Barnes C, Wong P, Egan B, Speller T, Cameron F, Jones G, et al. Reduced bone density among children with severe hemophilia. *Pediatrics*. 2004;114(2):177–81.

Barretti DL, Magalhães F de C, Fernandes T, do Carmo EC, Rosa KT, Irigoyen MC, et al. Effects of aerobic exercise training on cardiac renin angiotensin system in an obese Zucker rat strain. *PLoS One*. 2012;7(10):e46114.

Barzilay JI, Abraham L, Heckbert SR, Cushman M, Kuller LH, Resnick HE, et al. The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Diabetes*. 2001;50(10):2384-9.

Bearne LM, Scott DL, Hurley MV. Exercise can reverse quadriceps sensorimotor dysfunction that is associated with rheumatoid arthritis without exacerbating disease activity. *Rheumatology*. 2002;41(2):157-66.

Bellew JW, Gehrig L. A comparison of bone mineral density in adolescent female swimmers, soccer players, and weight lifters. *Pediatr Phys Ther*. 2006;18(1):19-22.

Beltrame LG, Abreu L, Almeida J, Boullosa DA. The acute effect of moderate intensity. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2015;35(3):191-6.

Benatti FB, Pedersen BK. Exercise as an anti-inflammatory therapy for rheumatic diseases-myokine regulation. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(2):86-97.

Bhat V, Olmer M, Joshi S, Durden DL, Cramer TJ, Barnes RFW, et al. Vascular remodeling underlies rebleeding in haemophilic arthropathy. *Am J Hematol*. 2015;90(11):1027-35.

Blamey G, Forsyth A, Zourikian N, Short L, Jankovic N, De Kleijn P, et al. Comprehensive elements of a physiotherapy exercise programme in haemophilia - a global perspective. *Haemophilia*. 2010;16(Suppl 5):136-45.

Blanchette VS, Manco-Johnson M, Santagostino E, Ljung R. Optimizing factor prophylaxis for the haemophilia population: where do we stand? *Haemophilia*. 2004;10(Suppl. 4):97-104.

Boettger MK, Krucker S, Gajda M, Schaible HG, Hilberg T. Repeated autologous intraarticular blood injections as an animal model for joint pain in haemophilic arthropathy. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(5):R148

Borghi SM, Pinho-Ribeiro FA, Zarpelon AC, Cunha TM, Alves-Filho JC, Ferreira SH, Cunha FQ, et al. Interleukin-10 limits intense acute swimming-induced muscle mechanical hyperalgesia in mice. *Exp Physiol*. 2015;100(5):531-44.

Bossard D, Carrillon Y, Stieltjes N, Larbre JP, Laurian Y, Molina V, et al. Management of haemophilic arthropathy. *Haemophilia*. 2008;14(Suppl 4):11-9.

Boulé NG, Haddad E, Kenny GP, Wells GA, Sigal RJ. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. *JAMA*. 2001;286(10):1218-27.

Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, Huber CM, Guzman RE, Juneau PL, et al. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003;11(11):821-30.

Burkhardt H, Schwingel M, Menninger H, Macartney HW, Tschesche H. Oxygen radicals as effectors of cartilage destruction. Direct degradative effect on matrix components and indirect action via activation of latent collagenase from polymorphonuclear leukocytes. *Arthritis Rheum*. 1986;29(3):379-87.

Buzzard BM. Physiotherapy for the prevention of articular contraction in haemophilia. *Haemophilia*. 1999;5(Suppl)1:10-5.

Buzzard BM. Physiotherapy, rehabilitation and sports in countries with limited replacement coagulation factor supply. *Haemophilia*. 2007;13(Suppl 2):44-6.

Cai ZY, Wen-Chyuan Chen K, Wen HJ. Effects of a group-based step aerobics training on sleep quality and melatonin levels in sleep-impaired postmenopausal women. *J Strength Cond Res*. 2014;28(9):2597-603

Calefi M, Bernades M, Miranda J, Machado J, Almeida J. Aquatic therapy in the treatment of patients with coagulopathy. *Haemophilia*. 2006;12(Suppl. 2):131-2

Cawston TE, Wilson AJ. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006;20(5):983-1002.

Chacur M, Milligan ED, Sloan EM, Wieseler-Frank J, Barrientos RM, Martin D, et al. Snake venom phospholipase A2s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. *Pain*. 2004;108(1-2):180-91.

Chua RA, Arbiser JL The role of angiogenesis in the pathogenesis of psoriasis. *Autoimmunity*. 2009;42(7):574-9.

Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Veiga FH, Ferreira SH. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. *Br J Pharmacol*. 1999;126(1):45-50.

da Silva RA, Almeida FM, Olivo CR, Saraiva-Romanholo BM, Perini A, Martins MA, Carvalho CR. Comparison of the effects of aerobic conditioning before and after pulmonary allergic inflammation. *Inflammation*. 2015;38(3):1229-38.

Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol*. 2004;25(1):4-7.

Diaz B, Garcia R, Colmenero MD, Terrados N, Fernandes B, Marin B. Melatonin and gonadotropin hormones in pubertal sportsgirls. *Rev Esp Fisiol*. 1993;49(1):17-22.

Díaz López B, Colmenero Urquijo MD. Influence of physical training on the Syrian hamster's melatonin rhythm. *Neurosci Lett*. 2007;428(2-3):68-71.

Ding Y, Li J, Zhou Y, Rafols JA, Clark JC, Ding Y. Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. *Current Neurovascular Research*, 2006;3(1):15-23.

Dook JE, James C, Henderson NK, Price RI. Exercise and bone mineral density in mature female athletes. *Med Sci Sports Exerc*. 1997;29(3):291-6..

Dunn AL. Pathophysiology, diagnosis and prevention of arthropathy in patients with haemophilia. *Haemophilia*. 2011;17(4):571-8.

Ettinger WH, Burns R, Messier SP, Applegate W, Rejeski WJ, Morgan T, et al. A randomized trial comparing aerobic exercise and resistance exercise with a health education program in older adults with knee osteoarthritis. The Fitness Arthritis and Seniors Trial (FAST). *JAMA*. 1997;277(1):25-31.

Fearn M, Hill K, Williams S, Mudge L, Walsh C, McCarthy P, et al. Balance dysfunction in adults with haemophilia. *Haemophilia*. 2010;16(4):606-14.

Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J*. 2002;16(11):1335-47.

Fernandes T, Nakamuta JS, Magalhães FC, Roque FR, Lavini-Ramos C, Schettert IT, et al. Exercise training restores the endothelial progenitor cells number and function in hypertension: implications for angiogenesis. *J Hypertens*. 2012;30(11):2133-43

Ferretti M, Srinivasan A, Deschner J, Gassner R, Baliko F, Piesco N, et al. Anti-inflammatory effects of continuous passive motion on meniscal fibrocartilage. *J Orthop Res*. 2005;23(5):1165-71.

Frajacomo FT, Kannen V, Deminice R, Geraldino TH, Pereira-Da-Silva G, Uyemura SA, et al. Aerobic training activates interleukin 10 for colon anticarcinogenic effects. *Med Sci Sports Exerc.* 2015;47(9):1806-13

Fransen M, Crosbie J, Edmonds J. Physical therapy is effective for patients with osteoarthritis of the knee: a randomized controlled clinical trial. *J Rheumatol.* 2001;28(1):156-64.

Gallach JE, Querol F, González LM, Pardo A, Aznar JA. Posturographic analysis of balance control in patients with haemophilic arthropathy. *Haemophilia.* 2008;14(2):329-35.

Gallacher SJ, Deighan C, Wallace AM, Cowan RA, Fraser WD, Fenner JA, et al. Association of severe haemophilia A with osteoporosis: a densitometric and biochemical study. *Q J Med.* 1994;87(3):181-6.

Gay ND, Lee SC, Liel MS, Sochacki P, Recht M, Taylor JA. Increased fracture rates in people with haemophilia: a 10-year single institution retrospective analysis. *Br J Haematol.* 2015;170(4):584-93

Gerstner G, Damiano ML, Tom A, Worman C, Schultz W, Recht M, et al. Prevalence and risk factors associated with decreased bone mineral density in patients with haemophilia. *Haemophilia.* 2009;15(2):559-65.

Gilbert MS. Musculoskeletal complications of haemophilia: the joint. *Haemophilia.* 2000;6(Suppl 1):34-7.

Gomes da Silva S, Simões PS, Mortara RA, Scorza FA, Cavalheiro EA, Da Graça Naffah-Mazzacoratti M, et al. Exercise-induced hippocampal anti-inflammatory response in aged rats. *J Neuroinflammation.* 2013;10:61

Gómez-Bruton A, González-Agüero A, Gómez-Cabello A, Casajús JA, Vicente-Rodríguez G. Is bone tissue really affected by swimming? A systematic review. *PLoS One.* 2013;8(8):e70119

Gomis M, Querol F, Gallach JE, González LM, Aznar JA. Exercise and sport in the treatment of haemophilic patients: a systematic review. *Haemophilia.* 2009;15(1):43-54.

Gomis M, Querol F, Gallach JE, González LM, Aznar JA. Exercise and sport in the treatment of haemophilic patients: a systematic review. *Haemophilia.* 2009;15(1):43-54

González LM, Querol F, Gallach JE, Gomis M, Aznar VA. Force fluctuations during the Maximum Isometric Voluntary Contraction of the quadriceps femoris in haemophilic patients. *Haemophilia.* 2007;13(1):65-70.

Groen WG, den Uijl IE, van der Net J, Grobbee DE, de Groot PG, Fischer K. Protected by nature? Effects of strenuous physical exercise on FVIII activity in moderate and mild haemophilia A patients: a pilot study. *Haemophilia*. 2013;19(4):519-23.

Gruodyte R, Jurimae J, Cicchella A, Stefanelli C, Passariello C, Jürimäe T. Adipocytokines and bone mineral density in adolescent female athletes. *Acta Paediatrica*. 2010;99(12):1879-84.

Hakobyan N, Enockson C, Cole AA, Sumner DR, Valentino LA. Experimental haemophilic arthropathy in a mouse model of a massive haemarthrosis: gross, radiological and histological changes. *Haemophilia*. 2008;14(4):804-9.

Hakobyan N, Kazarian T, Jabbar AA, Jabbar KJ, Valentino LA. Pathobiology of hemophilic synovitis I: overexpression of mdm2 oncogene. *Blood*. 2004;104(7):2060-4.

Harris S, Boggio LN. Exercise may decrease further destruction in the adult haemophilic joint. *Haemophilia*. 2006;12(3):237-40.

Hedbom E, Häuselmann HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(1):45-53.

Heijnen L, de Kleijn P. Physiotherapy for the treatment of articular contractures in haemophilia. *Haemophilia*. 1999;5(Suppl 1):16-9.

Heijnen L. The role of rehabilitation and sports in haemophilia patients with inhibitors. *Haemophilia*. 2008;14(Suppl 6):45-51.

Helmark IC, Mikkelsen UR, Børglum J, Rothe A, Petersen MC, Andersen O, et al. Exercise increases interleukin-10 levels both intraarticularly and peri-synovially in patients with knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(4):R126.

Henle ES, Linn S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 1997;272(31):19095-8.

Hermans C, De Moerloose P, Fischer K, Holstein K, Klamroth R, Lambert T, et al. Management of acute haemarthrosis in haemophilia A without inhibitors: literature review, European survey and recommendations. *Haemophilia*. 2011;17(3):383-92.

Hilberg T, Herbsleb M, Gabriel HH, Jeschke D, Schramm W. Proprioception and isometric muscular strength in haemophilic subjects. *Haemophilia*. 2001;7(6):582-8.

Hill K, Fearn M, Williams S, Mudge L, Walsh C, McCarthy P, et al. Effectiveness of a balance training home exercise programme for adults with haemophilia: a pilot study. *Haemophilia*. 2010;16(1):162-9.

Hoffman M. Animal models of bleeding and tissue repair. *Haemophilia*. 2008;14(Suppl. 3):62-7

Hoffman M, Harger A, Lenkowski A, Hedner U, Roberts HR, Monroe DM. Cutaneous wound healing is impaired in hemophilia B. *Blood*. 2006;108:3053-60.

Hollinger J, Onikepe A, MacKrell J, Einhorn T, Bradica G, Lynch S, et al. Accelerated fracture healing in the geriatric, osteoporotic rat with recombinant human platelet-derived growth Factor-BB and an injectable beta-tricalcium phosphate/collagen matrix. *J Orthop Res*. 2008;26(1):83-90.

Hooiveld M, Roosendaal G, Vianen M, van den Berg M, Bijlsma J, Lafeber F. Blood-induced joint damage: longterm effects in vitro and in vivo. *J Rheumatol*. 2003;30(2):339-44.

Hooiveld M, Roosendaal G, Wenting M, van den Berg M, Bijlsma J, Lafeber F. Short-term exposure of cartilage to blood results in chondrocyte apoptosis. *Am J Pathol*. 2003;162(3):943-51.

Hooiveld MJ, Roosendaal G, Jacobs KM, Vianen ME, van den Berg HM, Bijlsma JW, et al. Initiation of degenerative joint damage by experimental bleeding combined with loading of the joint: a possible mechanism of hemophilic arthropathy. *Arthritis Rheum*. 2004;50(6):2024-31.

Hooiveld MJ, Roosendaal G, van den Berg HM, Bijlsma JW, Lafeber FP. Haemoglobin-derived iron-dependent hydroxyl radical formation in blood-induced joint damage: an in vitro study. *Rheumatology*. 2003;42(6):784-90.

Hooiveld MJ, Roosendaal G, Vianen ME, van den Berg HM, Bijlsma JW, Lafeber FP. Immature articular cartilage is more susceptible to blood-induced damage than mature articular cartilage: an in vivo animal study. *Arthritis Rheum*. 2003;48(2):396-403.

Hoots WK. Pathogenesis of hemophilic arthropathy. *Semin Hematol*. 2006;43(1 Suppl 1):S18-22.

Hough AJ, Banfield WG, Sokoloff L. Cartilage in hemophilic arthropathy. Ultrastructural and microanalytical studies. *Arch Pathol Lab Med*. 1976;100(2):91-6.

Isanejad A, Alizadeh AM, Amani Shalamzari S, Khodayari H, Khodayari S, Khor V, et al. MicroRNA-206, let-7a and microRNA-21 pathways involved in the anti-angiogenesis effects of the interval exercise training and hormone therapy in breast cancer. *Life Sci.* 2016;151:30-40.

Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol.* 2000;63(1):17-31.

Jansen NW, Roosendaal G, Hooiveld MJ, Bijlsma JW, van Roon JA, Theobald M, et al. Interleukin-10 protects against blood-induced joint damage. *Br J Haematol.* 2008;142(6):953-61.

Jansen NW, Roosendaal G, Lafeber FP. Understanding haemophilic arthropathy: an exploration of current open issues. *Br J Haematol.* 2008;143(5):632-40.

Jansen NW, Roosendaal G, Lundin B, Heijnen L, Mauser-Bunschoten E, Bijlsma JW, et al. The combination of the biomarkers urinary C-terminal telopeptide of type II collagen, serum cartilage oligomeric matrix protein, and serum chondroitin sulfate 846 reflects cartilage damage in haemophilic arthropathy. *Arthritis Rheum.* 2009;60(1):290-8.

Jolliffe JA, Rees K, Taylor RS, Thompson D, Oldridge N, Ebrahim S. Exercise-based rehabilitation for coronary heart disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;(4):CD001800.

Jung KH, Hong SW, Zheng HM, Lee DH, Hong SS. Melatonin downregulates nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB during prevention of oxidative liver injury in a dimethylnitrosamine model. *J Pineal Res.* 2009;47(2):173-83

Katsarou O, Terpos E, Chatzismalis P, Provelengios S, Adraktas T, Hadjidakis D, et al. Increased bone resorption is implicated in the pathogenesis of bone loss in hemophiliacs: correlation with hemophilic arthropathy and HIV infection. *Ann Hematol.* 2010;89(1):67-74

Khawaji M, Astermark J, Von Mackensen S Bone density and health-related quality of life in adult patients with severe haemophilia. *Haemophilia.* 2011;17:304-11.

Koch AE, Distler O. Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(Suppl 2):S3.

Köiter J, van Genderen FR, Brons PP, Nijhuis-van der Sanden MW. Participation and risk-taking behaviour in sports in children with haemophilia. *Haemophilia.* 2009;15(3):686-94.

Kumar R, Bouskill V, Schneiderman JE, Pluthero FG, Kahr WH, Craik A, et al. Impact of aerobic exercise on haemostatic indices in paediatric patients with haemophilia. *Thromb Haemost.* 2016;115(6):1120-8.

Lacasse Y, Brosseau L, Milne S, Martin S, Wong E, Guyatt GH, et al. Pulmonary rehabilitation for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002;(3):CD003793.

Roosendaal G, Vianen ME, Wenting MJ, van Rinsum AC, van den Berg HM, Lafeber FP, et al. Iron deposits and catabolic properties of synovial tissue from patients with haemophilia. *J Bone Joint Surg Br.* 1998;80(3):540-5.

Lee BC, Hsu HC, Tseng WY, Su MYM, Chen SY, Wu YW, et al. Effect of cardiac rehabilitation on angiogenic cytokines in postinfarction patients. *Heart.* 2009;95(12):1012-8.

Lee H, Kim S, Kim D. Effects of exercise with or without light exposure on sleep quality and hormone responses. *J Exerc. Nutr Biochem.* 2014;18(3):293-299.

Lems WF, den Uyl D. Exercise-induced changes in interleukin-10 in patients with knee osteoarthritis: new perspectives? *Arthritis Res Ther.* 2010;12(4):131.

Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105(9):1135-43.

Liel MS, Greenberg DL, Recht M, Vanek C, Klein RF, Taylor JA. Decreased bone density and bone strength in a mouse model of severe factor VIII deficiency. *Br J Haematol.* 2012;158:140-3.

Lima F, De Falco V, Baima J, Carazzato JG, Pereira RM. Effect of impact load and active load on bone metabolism and body composition of adolescent athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33(8):1318-23.

Ljung R, Petrini P, Nilsson IM. Diagnostic symptoms of severe and moderate haemophilia A and B. A survey of 140 cases. *Acta Paediatr Scand.* 1990;79(2):196-200.

Löfqvist T, Nilsson IM, Berntorp E, Pettersson H. Haemophilia prophylaxis in young patients - a long-term follow-up. *J Intern Med.* 1997;241(5):395-400.

Lopez-Lopez C, LeRoit D, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor is required for vessel remodeling in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(26):9833-8.

Luck JV, Silva M, Rodriguez-Merchan EC, Ghalambor N, Zahiri CA, Finn RS. Hemophilic arthropathy. *J Am Acad Orthop Surg.* 2004;12(4):234-45.

Madhok R, York J, Sturrock RD. Haemophilic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1991;50(8):588-91.

Magkos F, Kavouras SA, Yannakoulia M, Karipidou M, Sidossi S, Sidossis LS. The bone response to non-weight-bearing exercise is sport-, site-, and sexspecific. *Clin J Sport Med*. 2007;17(2):123-8.

Maimoun L, Coste O, Philibert P, Briot K, Mura T, Galtier F, et al. Testosterone secretion in elite adolescent swimmers does not modify bone mass acquisition: a 1-year follow-up study. *Fertil Steril*. 2013;99(1):270-8.

Maimoun L, Mariano-Goulart D, Couret I, Manetta J, Peruchon E, Micallef JP, et al. (2004) Effects of physical activities that induce moderate external loading on bone metabolism in male athletes. *J Sports Sci*. 2004;22(9):875–83.

Mainardi CL, Levine PH, Werb Z, Harris ED. Proliferative synovitis in hemophilia: biochemical and morphologic observations. *Arthritis Rheum*. 1978;21(1):137-44.

Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD, Riske B, Hacker MR, Kilcoyne R, et al. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *New Engl J Med*. 2007;357(6):535-44.

Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am*. 1971;53(3):523-37.

Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias: progress and problems. *Semin Hematol*. 1999;36(4 Suppl 7):104-17.

Mansouritorghabeh H, Rezaieyazdi Z, Badiei Z. Are individuals with severe haemophilia A prone to reduced bone density? *Rheumatol Int*. 2008;28(11):1079-83.

Mansouritorghabeh H, Rezaieyazdi Z, Nayyereh S, SaghaW M, Mirfeizi Z, Rezaie J. Reduced bone density in individuals with haemophilia B. *Int J Rheum Dis*. 2009;12(2):125-9.

Mansouritorghabeh H, Rezaieyazdi Z, Rezai J. Reduced bone density in individuals with combined factor V and VIII deficiency. *Haemophilia*. 2007;13(3):340-3

Matsumoto T, Nakagawa S, Nishida S, Hirota R. Bone density and bone metabolic markers in active collegiate athletes: findings in long-distance runners, judoists, and swimmers. *Int J Sports Med*. 1997;18(6):408-12.

McCulloch RG, Bailey DA, Whalen RL, Houston CS, Faulkner RA, Craven BR. Bone density and bone mineral content of adolescent soccer athletes and competitive swimmers. *Pediatr Exerc Sci*. 1992;4(4):319–330.

McDonald A, Hoffman M, Hedner U, Roberts HR, Monroe DM. Restoring hemostatic thrombin generation at the time of cutaneous wounding does not normalize healing in hemophilia B. *J Thromb Haemost*. 2007;5(8):1577–83.

Medeiros A, Oliveira EM, Gianolla R, Casarini DE, Negrão CE, Brum PC. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(12):1909-17.

Miyazaki T, Hashimoto S, Masubuchi S, Honma S, Honma K. Phase advance shifts of human circadian pacemaker are accelerated by daytime physical exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;281(1):R197–R205.

Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:165-90.

Morris CJ, Blake DR, Wainwright AC, Steven MM. Relationship between iron deposits and tissue damage in the synovium: an ultrastructural study. *Ann Rheum Dis*. 1986;45(1):21-6.

Morris CJ, Earl JR, Trenam CW, Blake DR. Reactive oxygen species and iron--a dangerous partnership in inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*. 1995;27(2):109-22.

Morris CJ, Wainwright AC, Steven MM, Blake DR. The nature of iron deposits in haemophilic synovitis. An immunohistochemical, ultrastructural and X-ray microanalytical study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1984;404(1):75-85.

Mulder K, Cassis F, Seuser DR, Narayan P, Dalzell R, Poulsen W. Risks and benefits of sports and fitness activities for people with haemophilia. *Haemophilia*. 2004;10(Suppl 4):161-3.

Nader GA, Dastmalchi M, Alexanderson H, Grundtman C, Gernapudi R, Esbjörnsson M, et al. A longitudinal, integrated, clinical, histological and mRNA profiling study of resistance exercise in myositis. *Mol Med*. 2010;16(11-12):455-64.

Nakabayashi K, Sakamoto J, Kataoka H, Kondo Y, Hamaue Y, Honda Y, et al. Effect of continuous passive motion initiated after the onset of arthritis on inflammation and secondary hyperalgesia in rats. *Physiol Res*. 2016. [Epub ahead of print].

Niissalo S, Hukkanen M, Imai S, Tornwall J, Kontinen YT. Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;966:384-99.

Nishiya K. Stimulation of human synovial cell DNA synthesis by iron. *J Rheumatol.* 1994;21(10):1802-7.

Olofsson HE, Lövdahl S, Thorsson O, Berntorp E, Zetterberg E. Acute effects of exercise on specific and global coagulation parameters in severe haemophilia A. *Haemophilia.* 2015;21(5):e416-9.

Ovlisen K, Kristensen AT, Jensen AL, Tranholm M. IL-1 beta, IL-6, KC and MCP-1 are elevated in synovial fluid from haemophilic mice with experimentally induced haemarthrosis. *Haemophilia.* 2009;15(3):802-10.

Ovlisen K, Kristensen AT, Valentino LA, Hakobyan N, Ingerslev J, Tranholm M. Hemostatic effect of recombinant factor VIIa, NN1731 and recombinant factor VIII on needle-induced joint bleeding in hemophilia A mice. *J Thromb Haemost.* 2008;6(6):969-75.

Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev.* 2008;88(4):1379-406.

Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev.* 2000;80(3):1055-81.

Pedersen BK, Saltin B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sports.* 2006;16(Suppl 1):3-63.

Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, et al. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J Muscle Res Cell Motil.* 2003;24(2-3):113-9.

Pedersen BK, Steensberg A, Schjerling P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J Physiol.* 2001;536(Pt 2):329-37.

Perandini LA, Sales-de-Oliveira D, Mello S, Camara NO, Benatti FB, Lima FR, et al. Inflammatory cytokine kinetics to single bouts of acute moderate and intense aerobic exercise in women with active and inactive systemic lupus erythematosus. *Exerc Immunol Rev.* 2015;21:174-85.

Pergantou H, Platokouki H, Matsinos G, Papakonstantinou O, Papadopoulos A, Xafaki P, et al. Assessment of the progression of haemophilic arthropathy in children. *Haemophilia.* 2010;16(1):124-9.

Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol.* 2005;98(4):1154-62.

Pettersson H, Ahlberg A, Nilsson IM. A radiologic classification of hemophilic arthropathy. *Clin Orthop Relat Res*. 1980(149):153-9.

Pettersson H, Nilsson IM, Hedner U, Noréhn K, Ahlberg A. Radiologic evaluation of prophylaxis in severe haemophilia. *Acta Paediatr Scand*. 1981;70(4):565-70.

Piepoli MF, Davos C, Francis DP, Coats AJ, Collaborative E. Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). *BMJ*. 2004;328(7433):189.

Poole S, Cunha FQ, Selkirk S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Cytokine-Mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. *Br J Pharmacol*. 1995 Jun;115(4):684-8

Poon JL, Zhou ZY, Doctor JN, Wu J, Ullman MM, Ross C, et al. Quality of life in haemophilia A: Hemophilia Utilization Group Study Va (HUGS-Va). *Haemophilia*. 2012;18(5):699-707.

Pretolani M. Interleukin-10: an anti-inflammatory cytokine with therapeutic potential. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(9):1164-71.

Ravanbod RTG, Baghaipour MR, Nad-Ali F. Effects of ergometric exercise on aquatic exercise on coagulation factors in haemophiliacs. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2015;35(3):191-6.

Ravanbod R, Torkaman G, Esteki A. Biotribological and biomechanical changes after experimental haemarthrosis in the rabbit knee. *Haemophilia*. 2011;17(1):124-33.

Rengel Y, Ospelt C, Gay S. Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(5):221.

Rezaeifarid M, Soveid M, Ghaemi S, Karimi M. Bone mineral density in Iranian patients with haemophilia: the first experience in southern Iran. *Haemophilia*. 2011 May;17(3):552-3.

Rodriguez-Merchan EC, Jimenez-Yuste V, Aznar JA, Hedner U, Knobe K, Lee CA, et al. Joint protection in haemophilia. *Haemophilia*. 2011;17(Suppl 2):1-23.

Rodríguez-Merchán EC. Effects of hemophilia on articulations of children and adults. *Clin Orthop Relat Res*. 1996(328):7-13.

Rodriguez-Merchan EC. Haemophilic synovitis: basic concepts. *Haemophilia*. 2007;13(Suppl 3):1-3.

Rodríguez-Merchán EC. Pathogenesis, early diagnosis, and prophylaxis for chronic hemophilic synovitis. *Clin Orthop Relat Res*. 1997(343):6-11.

Roosendaal G, Mauser-Bunschoten EP, De Kleijn P, Heijnen L, van den Berg HM, Van Rinsum AC, et al. Synovium in haemophilic arthropathy. *Haemophilia*. 1998;4(4):502-5.

Roosendaal G, Tekoppele JM, Vianen ME, van den Berg HM, Lafeber FP, Bijlsma JW. Articular cartilage is more susceptible to blood induced damage at young than at old age. *J Rheumatol*. 2000;27(7):1740-4.

Roosendaal G, TeKoppele JM, Vianen ME, van den Berg HM, Lafeber FP, Bijlsma JW. Blood-induced joint damage: a canine in vivo study. *Arthritis Rheum*. 1999;42(5):1033-9.

Roosendaal G, Vianen ME, Marx JJ, van den Berg HM, Lafeber FP, Bijlsma JW. Blood-induced joint damage: a human in vitro study. *Arthritis Rheum*. 1999;42(5):1025-32.

Roosendaal G, Vianen ME, van den Berg HM, Lafeber FP, Bijlsma JW. Cartilage damage as a result of hemarthrosis in a human in vitro model. *J Rheumatol*. 1997;24(7):1350-4.

Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.

Roy S, Ghadially FN. Synovial membrane in experimentally-produced chronic haemarthrosis. *Ann Rheum Dis*. 1969;28(4):402-14.

Roya R, Giti T, Reza BM, Fatemeh NA. Effects of ergometric exercise on F-VIII coagulant activity in mild and moderate haemophilia A: a chance to reduce injective replacement therapy. *Pakistan J Biol Sci*. 2006;9:2823-7.

Rutten K, Schiene K, Robens A, Leipelt A, Pasqualon T, Read SJ, et al. Burrowing as a non-reflex behavioural readout for analgesic action in a rat model of sub-chronic knee joint inflammation. *Eur J Pain*. 2014;18(2):204–212.

Saad Rached IC, Castro FM, Guzzo ML, de Mello SB. Anti-inflammatory effect of bee venom on antigen-induced arthritis in rabbits: influence of endogenous glucocorticoids *J Ethnopharmacol*. 2010;130(1):175-8.

Sambajon VV, Cillo JE, Gassner RJ, Buckley MJ. The effects of mechanical strain on synovial fibroblasts. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61(6):707-12.

Schäfer GS, Valderramas S, Gomes AR, Budib MB, Wolff ÁL, Ramos AA. Physical exercise, pain and musculoskeletal function in patients with haemophilia: a systematic review. *Haemophilia*. 2016;22(3):e119-29.

Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*. 1990;75(1):40-7.

Schulze-Tanzil G, Zreiqat H, Sabat R, Kohl B, Halder A, Müller RD, et al. Interleukin-10 and articular cartilage: experimental therapeutical approaches in cartilage disorders. *Curr Gene Ther*. 2009;9(4):306-15.

Sen D, Chapla A, Walter N, Daniel V, Srivastava A, Jayandharan GR. Nuclear factor (NF)- κ B and its associated pathways are major molecular regulators of blood-induced joint damage in a murine model of hemophilia. *J Thromb Haemost*. 2013;11(2):293-306.

Serrano E, Venegas C, Escames G, Sanchez-Muñoz C, Zabala M, Puertas A, et al. Antioxidant defence and inflammatory response in professional road cyclists during a 4-day competition. *J Sports Sci*. 2010;28(10):1047-56.

Seuser A, Boehm P, Kurme A, Schumpe G, Kurnik K. Orthopaedic issues in sports for persons with haemophilia. *Haemophilia*. 2007;13(Suppl 2):47-52.

Shalamzari SA, Agha-Alinejad H, Alizadeh S, Shahbazi S, Khatib ZK, Kazemi A, et al. The effect of exercise training on the level of tissue IL-6 and vascular endothelial growth factor in breast cancer bearing mice. *Iran J Basic Med Sci*. 2014;17(4):231-58.

Skogstrand K, Thorsen P, Norgaard-Pedersen B, Schendel DE, Sorensen LC, Hougaard DM. Simultaneous measurement of 25 inflammatory markers and neutrophins in neonatal dried blood spots by immunoassay with xMAP technology. *Clin Chem*. 2005;51(10):1854-66.

Soci UP, Fernandes T, Hashimoto NY, Mota GF, Amadeu MA, Rosa KT, et al. MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. *Physiol Genomics*. 2011;43(11):665-73.

Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Treatment Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia*. 2013;19(1):e1-47.

Srivastava A. Inflammation is key to hemophilic arthropathy. *Blood*. 2015;126(19):2175-76.

Starkie R, Ostrowski SR, Jauffred S, Febbraio M, Pedersen BK. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans. *FASEB J*. 2003;17(8):884-6.

Steensberg A, van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Klarlund Pedersen B. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol.* 2000;529(Pt 1):237-42.

Stein H, Duthie RB. The pathogenesis of chronic haemophilic arthropathy. *J Bone Joint Surg Br.* 1981;63B(4):601-9.

Stonebraker JS, Bolton-Maggs PH, Soucie JM, Walker I, Brooker M. A study of variations in the reported haemophilia A prevalence around the world. *Haemophilia.* 2010;16(1):20-32.

Su Y, Wong WY, Lail A et al. Long-term major joint outcomes in young adults with haemophilia: interim data from the HGDS. *Haemophilia.* 2007;13(4):387-90.

Sun HB, Nalim R, Yokota H. Expression and activities of matrix metalloproteinases under oscillatory shear in IL-1-stimulated synovial cells. *Connect Tissue Res.* 2003;44(1):42-9.

Sun HB, Yokota H. Reduction of cytokine-induced expression and activity of MMP-1 and MMP-13 by mechanical strain in MH7A rheumatoid synovial cells. *Matrix Biol.* 2002;21(3):263-70.

Sun HB. Mechanical loading, cartilage degradation, and arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1211:37-50.

Szekanecz Z, Koch AE. Chemokines and angiogenesis. *Curr Opin Rheumatol.* 2001;13:202-8.

Teyssler P, Kolostova K, Bober V. Assessment of pain threshold in haemophilic patients. *Haemophilia.* 2014;20(2):207-11.

Thakur V, Gonzalez M, Pennington K, Nargis S, Chattopadhyay M. Effect of exercise on neurogenic inflammation in spinal cord of Type 1 diabetic rats. *Brain Res.* 2016;1642:87-94.

Tiktinsky R, Falk B, Heim M, Martinovitz U. The effect of resistance training on the frequency of bleeding in haemophilia patients: a pilot study. *Haemophilia.* 2002;8(1):22-7.

Tiku ML, Liesch JB, Robertson FM. Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. Enhancement by cytokines. *J Immunol.* 1990;145(2):690-6.

Tlacuilo-Parra A, Morales-Zambrano R, Tostado-Rabago N, Esparza-Flores MA, Lopez-Guido B, Orozco-Alcala J. Inactivity is a risk factor for low bone mineral density among haemophilic children. *Br J Haematol*. 2008;140(5):562–7.

Torzilli PA, Bhargava M, Park S, Chen CT. Mechanical load inhibits IL-1 induced matrix degradation in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(1):97-105.

Utukuri MM, Goddard NJ. Haemophilic arthropathy of the elbow. *Haemophilia*. 2005;11(6):565–70.

Uzun A, Baltaci AK, Kilic M, Mogulkoc R. The effect of acute swimming exercise on plasma melatonin levels in rats. *Bratisl Lek Listy*. 2012;113(2):64-6.

Vale ML, Marques JB, Moreira CA, Rocha FA, Ferreira SH, Poole S, et al. Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;304(1):102-8.

Valentino LA, Hakobyan N, Rodriguez N, Hoots WK. Pathogenesis of haemophilic synovitis: experimental studies on blood-induced joint damage. *Haemophilia*. 2007;13(Suppl 3):10-3.

van Baar ME, Dekker J, Oostendorp RA, Bijl D, Voorn TB, Lemmens JA, et al. The effectiveness of exercise therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee: a randomized clinical trial. *J Rheumatol*. 1998;25(12):2432-9.

Van Den Ende CH, Vliet Vlieland TP, Munneke M, Hazes JM. Dynamic exercise therapy for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000(2):CD000322.

van Meegeren ME, Roosendaal G, Coeleveld K, Nieuwenhuizen L, Mastbergen SC, Lafeber FP. A single intra-articular injection with IL-4 plus IL-10 ameliorates blood-induced cartilage degeneration in haemophilic mice. *Br J Haematol*. 2013;160(4):515-20.

van Meegeren ME, Roosendaal G, Jansen NW, Wenting MJ, van Wesel AC, van Roon JA, Lafeber FP. IL-4 alone and in combination with IL-10 protects against blood-induced cartilage damage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(7):764-72.

van Vulpen LFD, Schutgens REG, Coeleveld K, Alsema EC, Roosendaal G, Mastbergen SC, et al. IL-1b, in contrast to TNFa, is pivotal in blood-induced cartilage damage and is a potential target for therapy. *Blood*. 2015;126(19):2239-46.

Veneroso C, Tuñón MJ, González-Gallego J, Collado PS. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. *J Pineal Res.* 2009;47(2):184-91.

Verri WA Jr, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther.* 2006 Oct;112(1):116-38.

Von Mackensen S. Quality of life and sports activities in patients with haemophilia. *Haemophilia.* 2007;13(Suppl 2):38-43.

Wallny TA, Scholz DT, Oldenburg J, Nicolay C, Ezziddin S, Pennekamp PH, et al. Osteoporosis in haemophilia – an underestimated comorbidity? *Haemophilia.* 2007;13(1):79-84.

Walsh DA, Bonnet CS, Turner EL, Wilson D, Situ M, McWilliams DF. Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15(7):743-51.

Wen FQ, Jabbar AA, Chen YX, Kazarian T, Patel DA, Valentino LA. c-myc proto-oncogene expression in hemophilic synovitis: in vitro studies of the effects of iron and ceramide. *Blood.* 2002;100(3):912-6.

Willett NJ, Thote T, Lin AS, Moran S, Raji Y, Sridaran S, et al. Intra-articular injection of micronized dehydrated human amnion/chorion membrane attenuates osteoarthritis development. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(1):R47.

Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett.* 1995;82-83:969-74.

World Federation of Haemophilia Web Site. About bleeding disorders Treatment (acessado dia 04 de julho de 2016). Available from: <http://www.wfh.org/en/page.aspx?pid=642>

Zetterberg E, Palmblad J, Wallensten R, Morfini M, Melchiorre D, Holmström. Angiogenesis is increased in advanced haemophilic joint disease and characterised by normal pericyte coverage. *Eur J Haematol.* 2014;92(3):256-62.

Zourikian N, Merlen C, Bonnefoy A, St-Louis J, Rivard GE. Effects of moderate-intensity physical exercise on pharmacokinetics of factor VIII and von Willebrand factor in young adults with severe haemophilia A: a pilot study *Haemophilia.* 2016;22(3):e177-83.